

# **Vorklinische Untersuchungen zur Wirkung einer Tumorstoffimpfung in der Therapie Human Papillomvirus-assoziiierter Tumorerkrankungen**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Corinna Hoffmann

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen:

1. Prof. Wolfgang Uckert
2. PD Dr. Günter Cichon
3. Prof. Birgit Sawitzki

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.12

*Für Achim*

## **Zusammenfassung**

Zelluläre Immunantworten übernehmen entscheidende Aufgaben bei der Erkennung und Zerstörung von Tumorgewebe. Neuartige Vakzinierungsstrategien zur Aktivierung dieser zellulären Immunantwort sind vielversprechende Ansätze zur Therapie von Tumoren. Humane Papillomvirus (HPV)-assoziierte Tumore sind aufgrund ihrer Virus-spezifischen Merkmale besonders interessant für immuntherapeutische Strategien. Bisherige klinische HPV-Impfstudien zeigen zwar die Aktivierung einer spezifischen zellulären Immunantwort, der erwünschte therapeutische Effekt einer Tumorreduktion bleibt jedoch aus. Mit dem Ziel, die Effektivität einer Vakzine-aktivierten Immunantwort gegen HPV-assoziierte Tumore auf Immunzelebene zu definieren, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit die Wirkung der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten HPV-Vakzine Ad-p14 im Mausmodell und an Untersuchungsmaterial humaner Tumore analysiert.

In Mäusen bildeten sich murine HPV<sup>+</sup> TC1-Tumore einer frühen Entwicklungsphase nach Vakzinierung mit Ad-p14 zurück. Tumore in einer späten Entwicklungsphase wuchsen dagegen in zwei Intervallen aus, obwohl in den Versuchstieren peripher HPV-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorlagen. Die immunologischen Eigenschaften der Tumorzellen, wie die Expression von HPV-Antigenen und die Expression der Haupt-Histokompatibilitätsantigene blieben dabei unverändert. Unterschiede zeigten sich in den Frequenzen Tumor-infiltrierender Lymphozyten; in progressiven Phasen wurden in den Tumorgewebe nur CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen, in Regressionsphasen dagegen zusätzlich zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Eine mehrfache Wiederholung der Vakzinierung veränderte weder das Tumorwachstum noch verstärkte sie die T-Zellantwort. Immunmodulatoren, wie Interferon- $\alpha$  oder depletierende CD4-spezifische Antikörper unterstützten dagegen die Wirkung der Vakzine und reduzierten das Tumorwachstum. Die Kombination mit DTA-1, einem antagonistischen Antikörper für den Glucocorticoid-induzierten Tumornekrosefaktor-Rezeptor, erhöhte die Anzahl zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur einfachen Vakzinierung und führte zu einer kompletten und dauerhaften Abstoßung der TC1-Tumore im Mausmodell. Zur weiterführenden Untersuchung im humanen HPV-assoziierten Zervixkarzinom einschließlich anderer Therapieansätze wurde in dieser Arbeit ein humanisiertes Mausmodell etabliert, in dem sich bereits die Wirkung des Immuntoxins SA2E testen ließ.

Parallel zu den Arbeiten in Mäusen durchgeführte Analysen mit HPV<sup>+</sup> Tumorgewebe des Menschen zeigten im Vergleich zu anderen Tumoren, wie Bronchial-, Kolonkarzinomen

oder Melanomen einen signifikant höheren Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und an *Forkhead Box P3*<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. Eine erhöhte Anzahl dieser Immunzellen wurde bereits in zervikalen intraepithelialen Neoplasien, den Vorstufen der Zervixkarzinome, nachgewiesen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die immunologischen Abläufe bei der Entwicklung HPV-assoziiierter Tumore mit denen vorangeschrittener chronischer Erkrankungen vergleichbar sind, in denen sich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten erschöpfen während sich gleichzeitig immunsuppressive Mechanismen verstärken. Somit ist bei einer Immuntherapie neben der Aktivierung der T-Zellantwort gleichfalls ein Eingriff in die immunsuppressiven Prozesse der Tumorumgebung erforderlich. Um die Entwicklung von Impfstoffen zur Therapie HPV-assoziiierter Tumore zu verbessern sind weitere Untersuchungen notwendig, in denen die Mechanismen der T-Zellerschöpfung und Immunsuppression, wie auch der Aktivierung von T-Zellen ausführlicher betrachtet werden.



## Abstract

Cellular immune responses are crucial to detect and destruct tumour tissue. Novel vaccination strategies, activating these responses represent a promising approach for the treatment of cancer. Due to viral characteristics, tumours evolving from chronic human papillomavirus (HPV) infections provide particular targets for immuno-therapeutic treatment. Current clinical trials and strategies have not yet proved efficacious for complete tumour regression. Addressing cellular immunological aspects of tumor vaccination, this work focused on effects of the therapeutic HPV vaccine Ad-p14 in a mouse model and in samples of human tumors.

In mice vaccination resulted in complete regression of early stage murine HPV<sup>+</sup> TC1 tumours. Despite the evidence of HPV-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, late stage TC1 tumour burden increased discontinuously. During that process, TC1 tumour cells preserved their immunological characteristics, such as expression of HPV antigens and of major histocompatibility complex molecules. But frequencies of tumour-infiltrating lymphocytes were different; in progressing tumours only CD4<sup>+</sup> T cells occurred, while in temporary regressing tumours also CD8<sup>+</sup> T cells were detected. Repetitive vaccination did not result in a remission of tumour growth or enhancement of a T-cell response. However, additional immune modulators, like interferon- $\alpha$  or depleting CD4-specific antibodies aggravated the effects of vaccination and reduced the tumour growth. In comparison to vaccination only, additional targeting of the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor by the antibody DTA-1 raised the number of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells and resulted in a complete and permanent TC1 tumour regression in the mouse model. A humanized mouse model that was established within the present work to assist analysis of human HPV-associated cervical cancer and to facilitate studies on therapeutic approaches, proved useful to test the effects of an immuno-toxin. Stagnation in tumour growth mediated by SA2E immuno-toxin was monitored as long as mice were therapeutically treated.

Human HPV<sup>+</sup> tumours revealed numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and especially of forkhead box P3<sup>+</sup> regulatory T cells that were significantly increased compared to melanoma, bronchial or colon carcinoma. Precancerous stages of HPV<sup>+</sup> tumours already showed these raised frequencies and distribution of immune cells.

The present work points to immunological exhaustion in the development of HPV-related tumours comparable to chronic diseases where CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell exhaust and immunosuppression by regulatory T cells increases at the same time. The data from the

mouse model and the human disease suggest that effective tumor immune therapy requires activation of cellular immune responses and control of immuno-suppressive mechanisms. For the development of appropriate strategies to enhance efficacy in HPV-associated tumour therapy, further knowledge of mechanisms involved in specific T-cell activation as well as in T-cell exhaustion and immunosuppression is necessary.

## Abkürzungen

β2-M	Beta2-Mikroglobulin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle, engl. <i>Antigen-Presenting Cell</i>
B7-H1	B7 Homolog 1
bp	Basenpaare
BLCL	B-lymphozytäre Zelllinie, engl. <i>B Lymphocyte Cell Line</i>
BS <sup>3</sup>	Bis[sulfosuccinimidyl]-Suberat
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie, engl. <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>
CMV	Zytomegalie-Virus, engl. <i>Cytomegalovirus</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle, engl. <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
CTLA-4	engl. <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CRA	Chrom-Freisetzungstest, engl. <i>Chromium Release Assay</i>
d	Esel, engl. <i>Donkey</i>
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle, engl. <i>Dendritic Cell</i>
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
EBV	Eppstein-Barr-Virus
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure; engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, engl. <i>Epidermal Growth Factor</i>
FACS	engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum, engl. <i>Fetal Calf Serum</i>
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	engl. <i>Forkhead Box P3</i>
FR	engl. <i>Far Red</i>
g	Ziege, engl. <i>Goat</i>
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase
GFP	engl. <i>Green Fluorescent Protein</i>
GITR	engl. <i>Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor-Related Protein</i>
GITR-L	engl. <i>Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein-Ligand</i>
GM-CSF	engl. <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>

h	Mensch; engl. <i>human</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	engl. <i>Horseradish Peroxidase</i>
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMP	Matrixprotein 1 des Influenzavirus
IP	Infektiöse Partikel
LC	Langerhanszelle, engl. <i>Langerhans Cell</i>
LCR	engl. <i>Long Control Region</i>
LSAB	engl. <i>Labeled Streptavidin Biotin</i>
m	Maus
MC	Monozyt, engl. <i>Monocyte</i>
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOI	engl. <i>Multiplicity of Infection</i>
NFκB	engl. <i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NK	Natürliche Killerzelle
NOD	engl. <i>None-Obese Diabetic</i>
PBMC	engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	B-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a-Protein
PGE2	Prostaglandin E2
POD	Peroxidase
PTF	Plasmidtransfektionsfluorolyse
r	Ratte
rab	Kaninchen, engl. <i>Rabbit</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	RPMI1640, Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten
SCID	engl. <i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tag	Proteinmarkierung
TCR	T-Zellrezeptor, engl. <i>T Cell Receptor</i>
TGF-β	engl. <i>Transforming Growth Factor β</i>

TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TNC	Tenascin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
ubi	Ubiquitin
VEGF	engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	iii
Abstract.....	v
Abkürzungen .....	vii
1 Einleitung .....	1
1.1 Die charakteristische Entwicklung Human Papillomvirus-assoziierter Tumore...	1
1.2 Tumorimmunologie und die besonderen Merkmale HPV-assoziierter Tumore ...	4
1.3 Immuntherapie HPV-assoziierter Tumore .....	9
1.4 Tiermodelle für die Evaluierung von Tumorthérapien.....	14
1.5 Fragestellung .....	16
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	18
2.1.2 Peptide .....	20
2.1.3 Antikörper und Tetramere .....	20
2.1.4 Zelllinien und Kulturmedien .....	22
2.1.5 Tierstämme .....	23
2.1.6 Menschliches Untersuchungsmaterial .....	24
2.1.7 Immuntoxin SA2E.....	24
2.1.8 DNA-Fragmente in Plasmiden und adenoviralen Vektoren.....	25
2.2 Genexpressionsanalyse.....	26
2.2.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese .....	26
2.2.2 TaqMan-Polymerasekettenreaktion.....	26
2.3 Darstellung von Proteinen .....	27
2.3.1 Anreicherung rekombinanter Proteine.....	27
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	27
2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse .....	27
2.3.4 Stabilisierung von Proteinen durch chemische Vernetzung.....	28
2.4 Zellbiologische Methoden .....	28

2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	28
2.4.2	Transformation von B-Zellen.....	29
2.4.3	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	29
2.4.4	Onkogenitätstest im Weichagar.....	30
2.4.5	Nachweis der Aktivierung des <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-cells</i> (NFκB)-Signalweges.....	31
2.4.6	Isolierung primärer Tumorzellen der Maus.....	32
2.4.7	Isolierung von Milzzellen der Maus.....	32
2.4.8	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut .....	32
2.4.9	Generierung und Reifung dendritischer Zellen .....	33
2.4.10	Dendritische Zellen für die Antigenpräsentation.....	33
2.4.11	Aktivierung spezifischer zytotoxischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (CTL).....	34
2.4.12	Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmolekülen und von intrazellulären Zytokinen.....	34
2.4.13	Nachweis der CTL-Aktivität durch Chromfreisetzung .....	35
2.4.14	Nachweis der CTL-Aktivität im VITAL-FR-Test.....	35
2.4.15	Plasmidtransfektionsfluorolyse .....	36
2.5	Tumormodell in der Maus .....	38
2.5.1	Transplantation primärer Tumore.....	38
2.5.2	Behandlung mit dem Immuntoxin SA2E .....	39
2.5.3	Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen im Tiermodell .....	39
2.6	(Immun)Histochemische Analyse .....	40
2.7	Statistische Auswertung .....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	T-Zellantwort und Tumorentwicklung nach Ad-p14-Vakzinierung in Mäusen .	42
3.1.1	Evaluation potentiell transformierender Eigenschaften des p14-Vakzinierungsgens .....	42
3.1.2	Interferon-γ-Sekretion HPV-reaktiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	43
3.1.3	Zytotoxische Aktivität HPV-reaktiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	44
3.1.4	Entwicklung HPV <sup>+</sup> Tumore in Mäusen nach Vakzinierung mit Ad-p14....	44

3.1.5	T-zellabhängige Tumorregression.....	45
3.1.6	Tumorregression in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer frühen Vakzinierung	46
3.1.7	Tumorregression nach wiederholter Vakzinierung zu späten Zeitpunkten .	48
3.1.8	Immunologische Eigenschaften der TC1-Tumore .....	49
3.1.9	Unterstützung der T-Zellantwort durch Immunmodulatoren .....	52
3.1.10	Einfluss des DTA-1 auf die Anzahl HPV-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	54
3.1.11	Einfluss des DTA-1 auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen.....	55
3.1.12	Herstellung eines rekombinanten Proteins zur Aktivierung des <i>Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Receptor</i> (GITR)-Signalweges .....	56
3.2	HPV-spezifische zelluläre Immunantwort beim Menschen .....	60
3.2.1	Präsentation des p14-Antigens zur Aktivierung HPV-spezifischer CTL....	60
3.2.2	Erkennung des Antigens und Produktion von Interferon- $\gamma$ durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	63
3.2.3	Zytotoxische Aktivität Antigen-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	66
3.2.4	Frequenz Tumor-infiltrierender Lymphozyten in humanen Tumorgeweben	69
3.2.5	Herstellung eines rekombinanten Proteins zur Aktivierung des humanen GITR-Signalweges .....	72
3.3	Etablierung eines murinen Modells mit humanen Zervixkarzinomen .....	76
3.3.1	Entwicklung des Transplantationsprotokolls .....	76
3.3.2	Eigenschaften der transplantierten humanen Tumore .....	78
3.3.3	Wirkung des Immuntoxins SA2E auf humane Zervixkarzinome im Xenotransplantationsmodell .....	80
4	Diskussion .....	82
4.1	Präambel .....	82
4.2	Die Aktivierung HPV-spezifischer CTL durch Vakzinierung mit Ad-p14.....	82
4.3	Die Rolle der T-Zellen in HPV <sup>+</sup> Tumoren .....	85
4.4	T-Zelleigenschaften und Entwicklung HPV <sup>+</sup> Tumore in Ad-p14-vakzinierten Mäusen .....	87

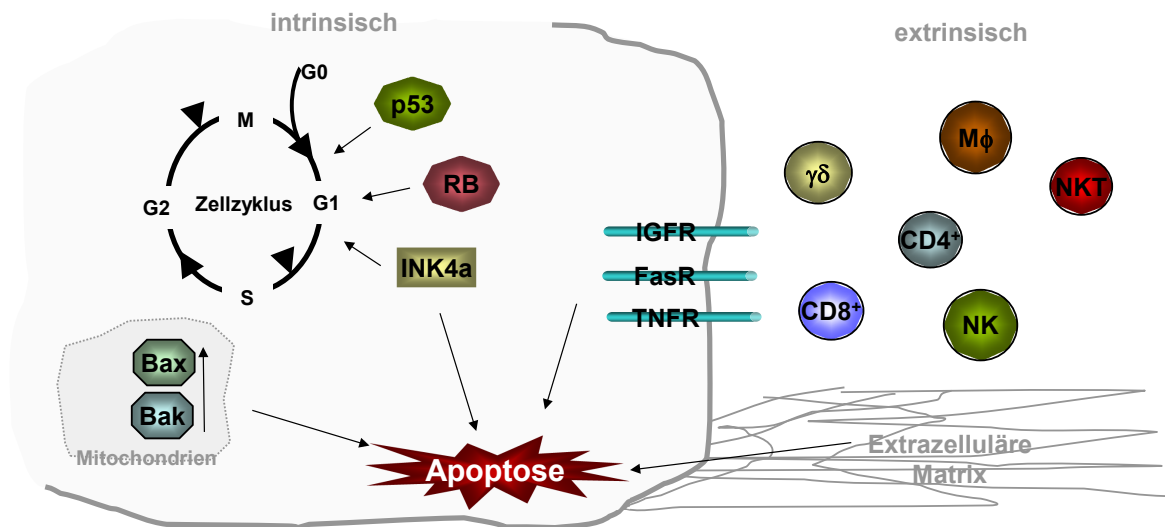


4.5	Verbesserung der Vakzine-aktivierten T-Zellantwort und Tumorregression in Mäusen .....	89
4.5.1	Kombination der Vakzine mit Immunmodulatoren.....	89
4.5.2	Rekombinantes Protein zur Aktivierung des GITR-Signalwegs.....	90
4.6	Konsequenzen und Perspektiven in der Immuntherapie von HPV-assoziierten Tumorerkrankungen .....	91
	Literaturverzeichnis.....	93
	Anhang .....	122
	Danksagung .....	122
	Erklärung .....	124

## **1 Einleitung**

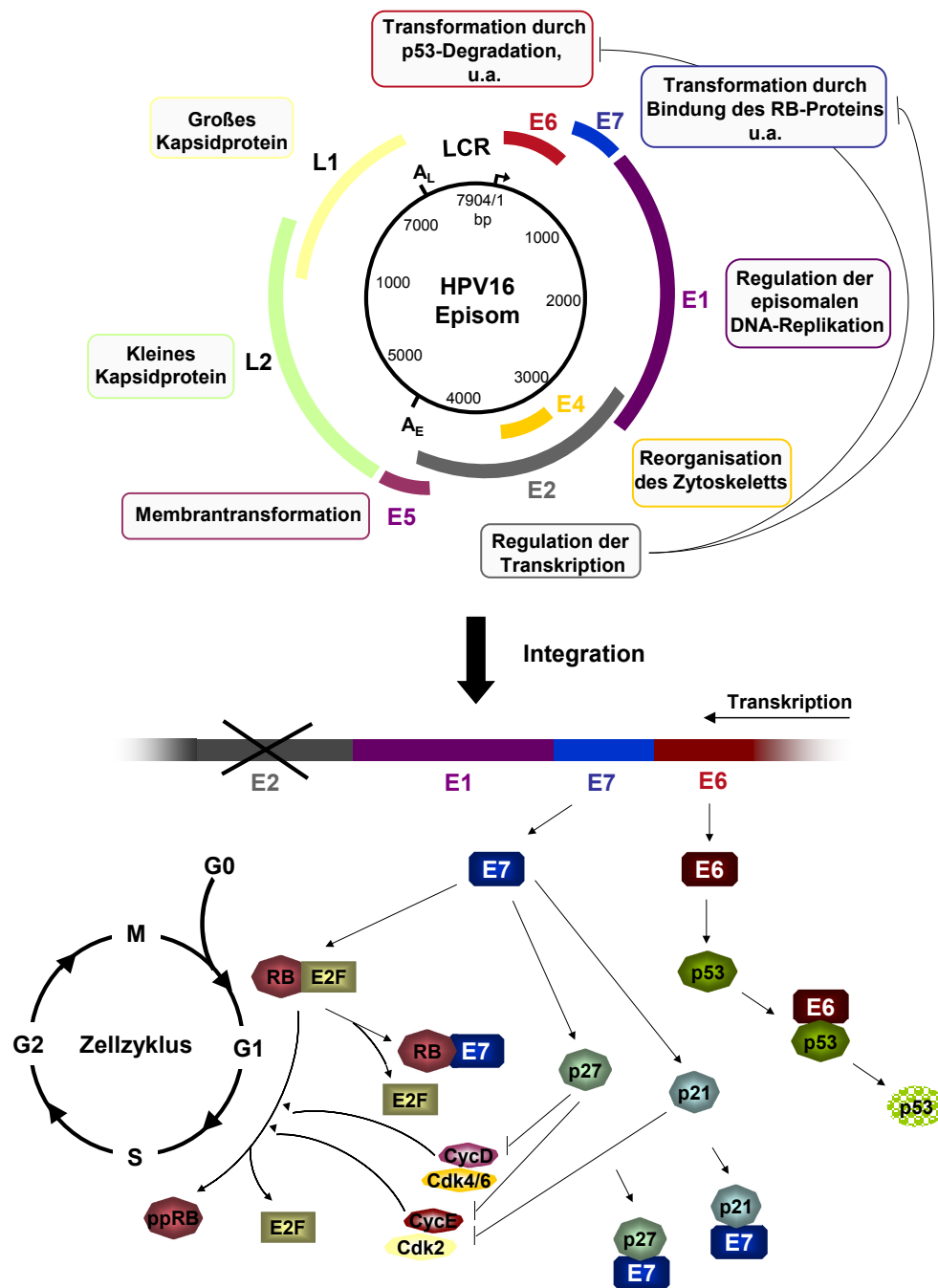
### **1.1 Die charakteristische Entwicklung Human Papillomvirus-assoziiierter Tumore**

Human Papillomvirus-assoziierte Tumore gehören zu den 10 bis 15% aller Tumorerkrankungen des Menschen, die sich aus einer chronischen Virusinfektion entwickeln [1]. Das humane Papillomvirus (HPV) zählt somit, neben dem Epstein–Barr-Virus (EBV), dem Kaposisarkom-assoziierten Herpesvirus, dem humanen T-lymphotropen Virus, dem Hepatitis B- und C-Virus, zu den humanen Tumor-assoziierten Virenarten. Die häufigste HPV-assoziierte Tumorart, wie auch die fünfthäufigste Tumorart bei Frauen weltweit, ist das Zervixkarzinom. Durchschnittlich erkranken 16 von 100.000 Frauen pro Jahr, 9 von 100.000 sterben daran [2]. Nahezu alle Zervixkarzinome, wie auch einige Hals-, Rachen- und Anogenitaltumore entstehen aus einer chronischen Infektion mit einem der mehr als 20 onkogenen HPV-Hochrisikotypen, 70% davon entwickeln sich aus einer Infektion der HPV-Typen 16 und 18 [3,4,5]. Ein Zusammenhang zwischen HPV und Zervixkarzinomen ließ sich erstmals 1976 nachweisen [6]. In den folgenden Jahren wurden daraufhin die Entwicklungsprozesse der Zervixkarzinome besonders ausführlich untersucht und grundlegende Unterschiede zu anderen Tumorarten, wie Brustkrebs oder Kolonkarzinomen aufgedeckt. Im Allgemeinen entwickelt sich ein Tumor in einem komplexen und langfristigen Prozess. Eine somatische Zelle verliert dabei infolge von Mutationen und epigenetischen Veränderungen wichtiger Proteinstrukturen ihr normales Wachstums- und Überlebensverhalten und beginnt unkontrolliert zu proliferieren. In diesem Prozess verändern Proteine, wie Zellteilungs-, Wachstums- und Differenzierungsproteine oft ihre Funktionen und bilden Onkoproteine; einige verlieren ihre Funktion, wie es häufig bei Tumorsuppressorproteinen beobachtet wird. Dem entgegen steht ein komplexes Netzwerk an Tumorsuppressoren. Es kontrolliert die Proliferation der Zelle und erst in Folge mehrerer Veränderungen entwickelt sich aus einer somatischen Zelle eine Tumorzelle (Abb. 1, [7,8]). Viele der bisher identifizierten Tumorsuppressoren greifen in diesem Netzwerk an verschiedenen Punkten ein und lösen die Reparatur, Apoptose oder Seneszenz der betroffenen Zelle aus. Intrinsisch kontrollieren zum Beispiel p53, RB oder der Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase INK4a die Proliferation der Zelle [9,10]. Extrinsisch wird die Proliferation unter anderem durch die extrazelluläre Matrix und die verschiedenen Faktoren und Zellen des Immunsystems kontrolliert [11].



**Abbildung 1: Beispiele intrinsischer und extrinsischer Tumorsuppression.** Intrazellulär kontrollieren Proteine, wie p53, RB oder INK4a (p16) die Proliferation (1-2). Mitochondrien reagieren auf Zellschäden und Stress mit der Ausschüttung einer Reihe proapoptotischer Effektoren, wie Bax/Bak-Proteine, die über die Aktivierung von Kaspasen ebenfalls den Zelltod einleiten können [12]. Verlieren diese Mechanismen ihre Funktion, wie zum Beispiel bei Mutationen im p53-Gen und die Zelle beginnt unkontrolliert zu proliferieren, dann greifen extrinsische Kontrollmechanismen. Dabei werden unkontrolliert wachsende Zellen anhand des Polaritätsverlustes und der Reduktion ihrer Zellverbindungen erkannt [13]. Veränderungen anderer Merkmale können von verschiedenen Faktoren und Zellen des Immunsystems erkannt werden. Die Zerstörung der normalen Gewebearchitektur, der extrazellulären Matrix, löst eine weitere Form des programmierten Zelltodes, Anoikis genannt, aus [14]. Über Todesrezeptoren, wie Fas oder NKG2D, die unter anderem durch Zellen des Immunsystems aktiviert werden, kann ebenfalls der Zelltod eingeleitet werden [15].

HPV-assoziierte Tumore, wie Zervixkarzinome, entwickeln sich nicht wie andere Tumorarten ausschließlich durch eine Ansammlung somatischer Mutationen. Sie entstehen in einem Virus-induzierten Prozess infolge einer chronischen HPV-Infektion. Das Virus, das aus einem ca. 8000 bp großen doppelsträngig-zirkulären DNA-Molekül besteht und von einer Proteinhülle aus 72 Kapsomeren umgeben ist, infiziert bevorzugt die basalen Plattenepithelzellen. Im Laufe einer chronischen Infektion kommt es häufig zur chromosomalen Integration des HPV-Genoms, welches die sechs frühen Gene E1, E2, E4, E5, E6 und E7 sowie die zwei späten Gene L1 und L2 codiert (Abb. 2). Dabei werden meist frühe Gene aber auch späte Gene deletiert [16]. Frühe Gene regulieren die virale DNA-Replikation, während späte Gene die Kapside für die Verpackung des Virusgenoms zur Verfügung stellen. Die Expression der viralen Gene korreliert mit dem Differenzierungsgrad der Plattenepithelzellen; so werden in den unteren Schichten die frühen und in den oberen Epithelschichten die späten Gene abgelesen. Auslöser für die Transformation infizierter Zellen ist letztendlich der Verlust des E2-Gens und die daraus resultierende unkontrollierte Expression der HPV-Onkogene E6 und E7 (Abb. 2).



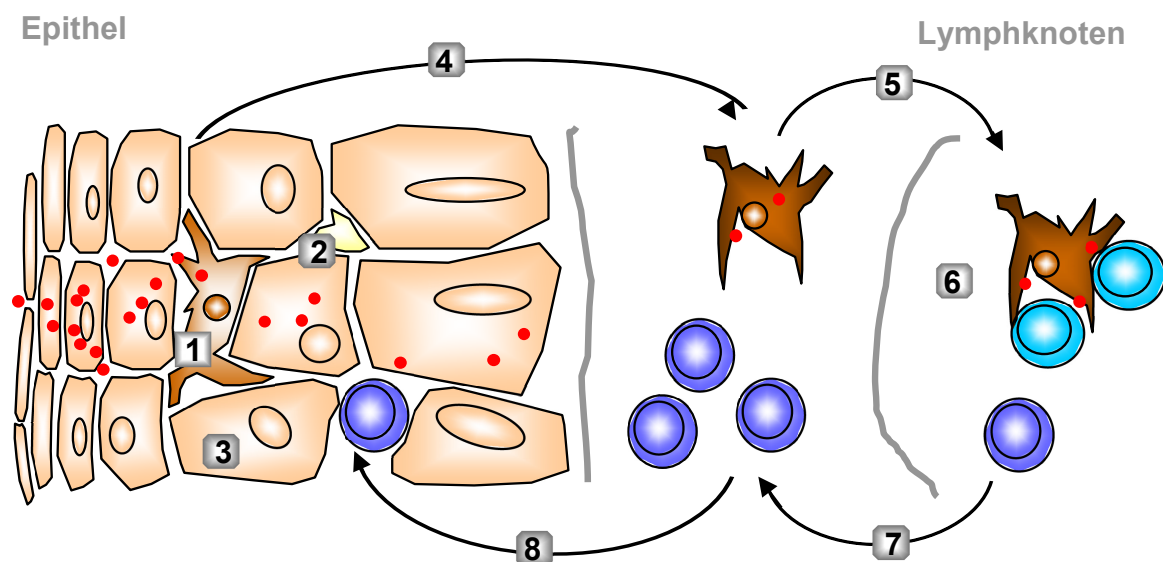
**Abbildung 2: Aufbau des HPV-Genoms - Funktion der Onkogene.** Das HPV-Genom ist im oberen Bildbereich schematisch als innerster Kreis dargestellt. Die im Replikationsverlauf gebildeten mRNAs, ihre Lage auf dem Genom und ihre Transkriptionsprodukte sind in den äußeren Kreisen dargestellt. Die *Long Control Region* (LCR), welche den Replikationsursprung und wichtige Promotoren für die Kontrolle der Genexpression enthält, sowie die Region, an der sich das Virusgenom der malignen HPV-Typen bei Integration in das Zellgenom bevorzugt öffnet, sind rot gekennzeichnet. Nach Integration und Verlust des E2-Gens, im unteren Bildbereich dargestellt, kommt es zur Überexpression der HPV-Onkogene. Hohe E6-Proteinkonzentrationen bewirken eine Beschleunigung des Ubiquitin (ubi)-abhängigen Abbaus von p53, was in einer eingeschränkten Zellzykluskontrolle und dem vermehrten Auftreten von DNA-Mutationen resultiert. Das E7-Protein unterstützt die Transformation durch die Bindung an das RB-, p27- und p21-Protein. Durch Bindung an RB verdrängt es den zellulären Transkriptionsfaktor E2F aus dem Proteinkomplex, die Bindung an p27 und p21 führt zur unkontrollierten Phosphorylierung und Inaktivierung von RB und der damit einhergehenden Freigabe von E2F, was in allen Fällen die Transkription E2F-regulierter Gene induziert und den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus einleitet.

Untersuchungen zur molekularen Funktion der Onkogene E6 und E7 zeigten erstmals, dass Tumoviren alternative Strategien besitzen, um Zellproliferation und Transformation auszulösen [17]. Gut beschrieben ist die Regulation der Tumorsuppressorproteine p53 und RB durch Interaktion mit E6- und E7-Proteinen (Abb. 2). Neueste Untersuchungen ergaben, dass die Onkoproteine auch mit weiteren Faktoren, die für den Zellzyklusablauf, die Telomeraseverfügbarkeit, die Apoptose und die chromosomale Stabilität verantwortlich sind, interagieren, um intrinsische Kontrollmechanismen zu umgehen oder zu blockieren und eine somatische Zelle zu transformieren [18]. Auch die extrinsische Kontrolle durch das Immunsystem ist durch die vielfachen Eigenschaften der viralen Proteine, wie zum Beispiel die durch das E5-Protein verursachte Einschränkung der Oberflächenexpression von *Major Histocompatibility Complex*-Molekülen der Klassen I (MHC-Klasse I) und II (MHC-Klasse II) [19,20].

## **1.2 Tumorimmunologie und die besonderen Merkmale HPV-assoziiierter Tumore**

Der Gedanke, dass das Immunsystem an der Zerstörung von Tumorgewebe beteiligt ist, wurde erstmals vor 100 Jahren dokumentiert [21,22]. Man machte die damals erstaunliche Entdeckung, dass sich durch Infektionskrankheiten induzierte Prozesse positiv auf die Therapie von malignen Erkrankungen auswirkten und behandelte Tumorpatienten zum Beispiel mit bakteriellen Toxinen. Etwa 40 Jahre später, nachdem man in Transplantationsexperimenten zelluläre Komponenten des Immunsystems charakterisiert hatte, die an der Erkennung und Abstoßung der Transplantate beteiligt sind, wurde dieses Konzept wieder aufgegriffen [23]. Als sich durch die Entwicklung von Mauseinzuchtstämmen die Möglichkeiten zur Untersuchung tumorimmunologischer Fragestellungen verbesserten, wurden Immunreaktionen auf Tumore und später auch die entscheidende Vermittlerrolle der T-Zellen nachgewiesen [24,25]. Auf diesen Grundlagen wurden verschiedene Hypothesen zur Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorentstehung und -zerstörung aufgestellt. Die komplexen Zusammenhänge und Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunfaktoren verdeutlichen sich in einer Vielzahl umstrittener Theorien. Nach der *Immunosurveillance*-Theorie beispielsweise werden transformierte Zellen kontinuierlich vom Immunsystem erkannt und eliminiert [26,27,28]. Eine modernere Version dieser Theorie, als *Cancer Immunoediting* bezeichnet, geht davon aus, dass das Immunsystem zusätzlich noch an der Selektion resistenter

Tumorvarianten und somit an der Tumorprogression beteiligt ist [29,30,31]. Alternative Theorien favorisieren zum Beispiel umgebungsbedingte oder gewebeabhängige Tumorspezifische Toleranzentwicklung [32,33,34,35] oder genetische Instabilität als Ursachen [36,37,38]. Obwohl in vielen Untersuchungen dokumentiert wurde, dass das Immunsystem in frühen und späten Phasen der Tumorentwicklung, wie auch bei der Eliminierung von Tumorzellen beteiligt ist [32,39], bleiben entscheidende Fragen unvollständig beantwortet: Wie werden transformierte Zellen vom Immunsystem erkannt und zerstört? Wie wird zwischen diesen transformierten Zellen und ihren normalen Vorläufern unterschieden? Tumorzellen können auf verschiedenen Ebenen des Immunsystems erkannt werden, größtenteils durch Faktoren der adaptiven Immunantwort (Abb. 3), aber auch durch Faktoren der angeborenen Immunität.



**Abbildung 3: T-Zellaktivierung.** (1) Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie Langerhanszellen (LC) im Epithel, nehmen Antigene im Gewebe auf. (2) Proinflammatorische Signale, die von infizierten Epithelzellen und humoralen Immunzellen abgegeben werden und (3) homöostatische Signale von nicht infizierten Zellen übertreffen müssen, (4) gewährleisten eine vollständige Reifung der LC in APC und (5) ihre effiziente Wanderung zu den Lymphknoten. (6) Dort werden Antigen-spezifische T- und B-Zellen aktiviert. Dazu werden die zuvor aufgenommenen Antigene von den APC prozessiert und den T-Zellen über den MHC-Klasse I und MHC-Klasse II präsentiert. Es werden nur T-Zellen aktiviert, deren T-Zellrezeptor (TCR) die MHC-Peptid-Komplexe spezifisch bindet ([40], Signal 1). Über den MHC-Klasse I werden die CD8+ zytotoxischen T-Zellen (CTL) aktiviert, über den MHC-Klasse II die CD4+ Helfer-T-Zellen (TH). Kostimulatorische Moleküle ([41], Signal 2), sowie bestimmte Zytokine ([42], Signal 3) sind notwendig, um eine effektive Immunantwort zu aktivieren. (7) Aktivierte CD4+ und CD8+ T-Zellen und Antikörperproduzierende B-Zellen wandern in die Zielgewebe ein und (8) sind nun in der Lage, Zielstrukturen zu erkennen und Zellen zu eliminieren. Durch die anschließende Bildung von Memory T- und B-Zellen bleibt die spezifische Immunität erhalten.

Verschiedene angeborene Faktoren der Immunantwort, wie das Komplementsystem [43] oder native Antikörper, richten sich gegen spezifische Oberflächenstrukturen auf Tumorzellen [44]. Hämatopoetische Zellen, wie Makrophagen, Granulozyten, natürliche

Killerzellen (NK-Zellen), MHC-unabhängige T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen ebenfalls die Fähigkeit, Tumorzellen durch angeborene Mechanismen zu erkennen und zu zerstören [45].

Die adaptive Immunantwort dagegen erkennt spezifische Strukturen der Tumorzellen und bildet daraufhin gezielt Abwehrmechanismen gegen diese Antigene aus, die durch B-Zellen und T-Zellen vermittelt werden (Abb. 3). B-Zellen exprimieren nach Antigenkontakt die für eine humorale Immunantwort spezifischen Antikörper [46]. Entscheidend bei der Zerstörung von Tumorzellen ist die zelluläre Immunantwort. Sie wird von den T-Zellen ausgeführt, die dazu von den APC, wie zum Beispiel dendritischen Zellen (DC), aktiviert werden müssen (Abb. 3). Aktivierte CTL erkennen mit Hilfe ihres TCR Tumor-spezifische Peptide, die ihnen über MHC-Moleküle präsentiert werden. Diese Proteine sind als Tumorantigene für definierte Tumore charakteristisch. Vorwiegend sind es körpereigene Proteine, die entweder mutiert sind (Tumor-spezifische Antigene, TSA), oder in Tumorzellen auf eine andere Weise exprimiert werden als in normalen Zellen (Tumor-assoziierte Antigene, TAA; Tab. 1).

**Tabelle 1: Humane Tumorantigene.** Angegeben ist eine Auswahl humaner Tumorantigene. Modifiziert nach Palena [47]

<b>Tumor-spezifische Antigene</b>	<b>Tumor-assoziierte Antigene</b>
<b>Mutierte Proteine</b>	Karzinomembriogenes Antigen
K-ras	Mucin 1
P53	Prostata-spezifisches Antigen
	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
<b>Fusionsproteine</b>	Wilm's tumor 1
Bcr-Abl	Her-2/neu
	NY-ESO-1
<b>Virale Proteine</b>	Cyclin D1
HPV-16 E6, HPV-16 E7	Mesothelin
Latenzproteine des EBV (EBNA1, LMP1, LMP2)	Survivin

Die charakteristischen Tumorantigene HPV-assoziiierter Tumore sind virale Proteine, wie E6 und E7. Dies ist eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Tumorarten, denn die meisten Tumore präsentieren nur körpereigene Proteine. T-Zellantworten gegen diese Autoantigene sind oft bereits eingeschränkt. Zum Schutz vor Autoimmunreaktionen werden spezifische T-Zellen entweder im Thymus deletiert oder besitzen regulatorische Eigenschaften. Diese Einschränkungen bestehen gegen virale Antigene, die Neoantigene

sind, nicht. Wie aber entgeht eine Tumorzelle mit viralen Antigenen trotzdem der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem? Wie alle Immunantworten, sind auch die gegen Tumorantigene zeitlich begrenzt. Die Mechanismen für die Beendigung einer Immunantwort sind bisher nicht genau definiert, man geht jedoch davon aus, dass verschiedene Zytokine, regulatorische T-Zellen und andere Faktoren die Immunreaktivität regulieren. Eine Vielzahl solcher als *Immune Escape* bezeichneter Mechanismen wurden in Tumorgewebe nachgewiesen (Tab. 2, [48,49,50,51]).

**Tabelle 2: Beispiele für Immune Escape Mechanismen im Tumorgewebe.** Modifiziert nach Igney [52]

Strategie	Mechanismus	Beispiel
Ignoranz	Mangel an inflammatorischen Signalen	Eingeschränkte Interferon (IFN)- $\gamma$ und IFN- $\alpha$ Ausschüttung
	Ausbleiben der Präsentation von Tumorantigenen in den lymphoiden Organen	geringe Anzahl an APC, tolerogene DC
	Mangel an Adhäsionsmolekülen	E-Cadherin
	Stroma-bedingte physiologische Barrieren	Vaskularisierung
Einschränkung der Antigenpräsentation	Expressionseinschränkung oder Mutation von Tumorantigenen	
	Expressionseinschränkung oder Mutation von MHC-Genen	Endozytotischer Abbau des Antigens in der Tumorzelle
	Defekte in Antigenprozessierungs- und Präsentationsmechanismen	Antigenpeptid-Transporter oder LPM-Defizienz
Expression von immunsuppressiven Faktoren	Zytokine	<i>Transforming Growth Factor</i> (TGF)- $\beta$ , Interleukin (IL)-10, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
	Prostaglandine	Prostaglandine (PG)E1 und E2
Toleranzinduktion	Einleitung der Anergie durch Verlust kostimulatorischer Moleküle	CD80/CD86-Moleküle
	Myeloische Suppressorzellen	
	Aktivierung regulatorischer Zellen	Unreife DC und Makrophagen
	T-Zelldeletion	STAT-1-, Fas-, oder <i>Programmed Death</i> (PD)-1- Signalweg
Apoptoseresistenz	Expression antiapoptotischer Moleküle	Hämoxygenase 1, <i>Inhibitor of apoptosis</i> -Protein
	Expressionseinschränkung oder Mutation pro-apoptotischer Moleküle	Bcl-2-Proteine, p53, c-myc
Gegenangriff	Expression von Todesrezeptoren	CD95L-, Expression des Liganden von PD-1 (PDL1)

Verschiedene Formen dieser *Immune-Escape*-Mechanismen, wie die Einschränkung in der Antigenpräsentation oder die Toleranzinduktion wurden auch in HPV-assoziierten



Tumoren beschrieben [53,54,55,56]. Einige dieser Mechanismen wurden bereits in den Vorstufen der HPV-Tumore, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) beobachtet. Um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, werden in einer HPV-infizierten Zelle verschiedene Mechanismen durch die HPV-Onkoproteine aktiviert [57,58], wie zum Beispiel die Blockierung der Aktivität von  $\text{INF-}\alpha$ , die zur Einschränkung der Peptidpräsentation auf der Zelloberfläche führt [59]. Des Weiteren ist der HPV-Infektionszyklus speziell an die Differenzierung der infizierten Zellen, den Keratinozyten, angepasst. Aus diesem Grund sterben Epithelzellen nicht verfrüht, die Struktur des Epithels bleibt somit erhalten und es werden keine Viruspartikel innerhalb des Epithels freigegeben. Den APC des Epithels, den LC, gelingt es nur selten virale Antigene aufzunehmen. Darüberhinaus fehlt ihnen, bedingt durch diese Umstände, der kostimulatorische Kontext, den sie benötigen, um T-Zellen effektiv aktivieren zu können. Dies führt letztendlich dazu, dass eine HPV-Infektion vom Immunsystem ignoriert oder toleriert wird und sich aus den betroffenen Zellen im Laufe der Zeit Tumorzellen entwickeln [60]. In den meisten Fällen wird die Immuntoleranz allerdings überwunden und eine HPV-Infektion oder eine anfängliche CIN heilen aus, bevor es zur Bildung maligner Gewebe kommt [61,62]. Effektoren einer HPV-spezifischen Immunantwort, wie zum Beispiel Immunglobuline vom Typ IgG und IgA,  $\text{T}_\text{H}$ -Zellen und CTL gegen verschiedene frühe und späte HPV-Proteine, wurden in Blutproben von HPV-infizierten Patienten beschrieben [60,63]. Die Bildung von Antikörpern, wie auch die Ausbildung einer  $\text{Typ2-T}_\text{H}$ -Antwort wurden interessanter Weise in sehr frühen Phasen der HPV<sup>+</sup> Zervixkarzinomentstehung und im weiteren Verlauf beobachtet [64,65]. Seltener als in gesunden Personen wurden in Zervixkarzinompatienten NK-Zellrezeptor-D-positive Zellen, wie NK-Zellen nachgewiesen, die eine Zerstörung von Tumorzellen durch die Bindung an das humane Leukozytenantigen (HLA)-A einleiten [66,67]. Die Anzahl der T-Zellen im Tumorgewebe war im Vergleich zu anderen Tumorarten besonders hoch, insbesondere die Zahl der regulatorischen T-Zellen ( $\text{T}_\text{reg}$ ) [56]. HPV-spezifische CTL konnten ebenso dokumentiert werden [62,68], waren aber stark eingeschränkt in ihren Funktionen, beispielsweise durch die verminderte Expression des im CD3-TCR-Komplex gebundenen  $\zeta$ -Proteins [69] oder aufgrund hoher Konzentrationen der immunsupprimierenden Indolamin-2,3-Dioxygenase [70,71]. Auch die CTL-Antwort unterstützenden Zytokine wie  $\text{IFN-}\gamma$  konnten im Tumorgewebe nur in geringen Mengen detektiert werden [71]. Gleichzeitig wurde aber die Sekretion verschiedener

immunsuppressorischer Zytokine, wie IL-10 [53,72], VEGF [73], PGE2 [74], TGF- $\beta$  [75] und IL-6 [76], überwiegend durch hämatopoetische Zellen des umgebenden Gewebes aber auch durch Tumorzellen beschrieben [77].

Somit sind T-Zellantworten auch gegen virale Antigene in Tumorgeweben stark eingeschränkt. Möglichkeiten zu finden, die solche Einschränkungen überwinden und eine Tumorimmunantwort aktivieren, reaktivieren oder verbessern, ist das Ziel der Forschung zur Entwicklung von Tumorimmuntherapien.

### **1.3 Immuntherapie HPV-assoziiierter Tumore**

Der Schwerpunkt der Tumorimmuntherapie liegt in der Generierung einer effektiven zellulären Immunantwort gegen Tumorantigene. Zur Aktivierung von Antigen-spezifischen CTL wurden bereits verschiedene Impfstrategien entwickelt. Anders als der Großteil der Vakzine, der prophylaktisch eingesetzt wird und sich auf die Aktivierung einer humoralen Immunantwort fokussiert, werden Tumorstoffe therapeutisch verwendet und richten sich auf die Aktivierung einer zellulären Immunantwort. Da 10 bis 20% aller Tumorerkrankungen durch Mikroorganismen verursacht werden, ist die Entwicklung von prophylaktischen Impfstoffen auf diesem Gebiet ebenso wichtig [78].

Gegen HPV-assoziierte Erkrankungen wurden zum Beispiel die prophylaktischen Impfstoffe Gardasil<sup>®</sup> (Merck) und Cervarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline) entwickelt, welche eine humorale Immunität gegen die Hüllproteine der häufigsten HPV-Typen induzieren und dadurch effektiv vor einer Infektion schützen [79,80]. Trotz dieser Erfolge in der Entwicklung prophylaktischer HPV-Vakzinen, ist es aufgrund hoher Kosten und begrenzter Verfügbarkeit der Impfstoffe in Entwicklungsländern unwahrscheinlich, dass die Verbreitung von HPV-Infektionen innerhalb der nächsten Jahre durch diesen prophylaktischen Ansatz reduziert werden kann. Die Infektionsraten mit HPV liegen derzeit weltweit bei Frauen unter 30 Jahren über 25%. Davon entwickeln durchschnittlich 30% der Frauen Zervixkarzinome, die mit einer hohen Sterblichkeitsrate verbunden sind.

Da bestehende Infektionen und Zervixkarzinome durch die prophylaktische Vakzinierung aber nicht beeinflusst werden, ist die Entwicklung therapeutischer Vakzine ebenso wichtig [81]. Zielmoleküle der zellulären Immuntherapie HPV-assoziiierter Tumorerkrankungen sind meist die Proteine der frühen viralen Gene, insbesondere der HPV-Onkogene E6 und E7. Da die beiden Onkogene essentiell für die Induktion und den Erhalt der Transformation sind und kontinuierlich von den Tumorzellen exprimiert werden, eignen

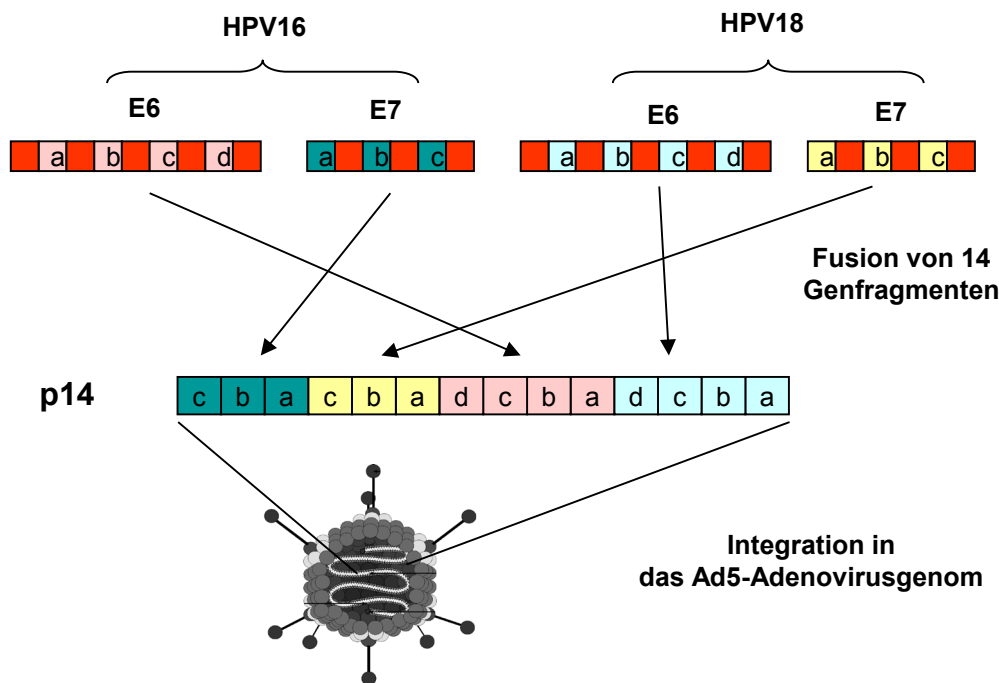
sie sich besonders gut als Ziel therapeutischer Impfstrategien. Aufgrund ihres viralen Ursprungs gehören E6 und E7 zu den Neoantigenen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass durch Impfung Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel die Vitiligo bei der Behandlung von Melanomen mit tumor-spezifischen Autoantigenen [82], induziert werden. Bislang wurden in Tierversuchen und in Patientenstudien verschiedene Strategien untersucht, in denen Tumorzellen selbst, Fusionen aus DC und Tumorzellen, oder DC beladen mit Tumorproteinen oder RNA, als Impfstoffe eingesetzt wurden, um Immunantworten gegen bekannte oder auch unbekannte Tumorstrukturen zu induzieren (Tab. 3.).

**Tabelle 3: Impfstrategien.** Modifiziert nach Palena [47]

<b>Impfstrategien mit Antigengemischen</b>	<b>Impfstrategien mit spezifischen Antigenen</b>
<b>Immunisierung mit Zellen</b>	<b>Immunisierung mit Zellen</b>
Autologe Tumorzellen	DC beladen mit Peptiden oder Proteinen
Allogene Tumorzellen	DC transfiziert mit DNA oder RNA
Genetisch modifizierte Tumorzellen	T-Zellen transduziert mit Tumorantigen-spezifischem TCR
DC/Tumor-Fusionszellen	
DC beladen mit Tumorlysate	<b>Immunisierung mit Peptiden oder Proteinen</b>
DC transfiziert mit Tumor-RNA	Proteine
	Peptide
<b>Immunisierung mit Peptiden oder Proteinen</b>	Agonistische Peptide
Tumorlysate	Antiidiotypische Mausantikörper
Hitzeschockproteine-Tumorpeptide	Mausantikörperfusionsproteine
	<b>Immunisierung mit Vektoren</b>
	Plasmid-DNA
	Bakterielle Vektoren (Listeria, Salmonella)
	Hefvektoren
	Virale Vektoren (Adenovirus, Vaccinia, Avipox, MVA)

Die beiden HPV-Onkogene E6 und E7 sind die Grundlage vieler Impfstoffe zur Immuntherapie HPV-assoziiierter Tumorerkrankungen. Als Bestandteil von DNA- oder Virus-basierten Vakzinen wurden ihre Sequenzen abgeändert um ihre onkogenen Eigenschaften zu vermindern oder auszuschließen [83,84]. Auf ähnliche Weise wurde in unserer Arbeitsgruppe die Adenovirus-basierte Vakzine Ad-p14 hergestellt [85]. Das

rekombinante Vakzinierungsgen p14 wurde aus 14 Fragmenten der HPV-Onkogene E6 und E7, der HPV-Typen 16 und 18 zusammengesetzt (Abb. 4).



**Abbildung 4: Herstellung der Adenovirus-basierten HPV-Vakzine Ad-p14.** Das Vakzinierungsgen setzt sich aus 14 verschiedenen Fragmenten der HPV-Onkogene E6 und E7, der Typen 16 und 18 zusammen. Onkogene Gensequenzen, wie beispielsweise die Zinkfingerdomäne und die PDZ-Domäne oder Sequenzbereiche, verantwortlich für die p53-Degradation und die Rb-Bindung wurden deletiert (rot gekennzeichnet). Die verbleibenden Sequenzbereiche sind entgegen ihrer natürlichen Abfolge fusioniert und in das Genom des replikationsdefizienten Adenovirus Ad5 kloniert worden [85].

Bei der Auswahl und der Anordnung der Sequenzabschnitte wurde speziell darauf geachtet, die antigenen Eigenschaften der viralen Gene zu erhalten und die transformierenden Eigenschaften, wie beispielsweise die p53-Degradation und die Rb-Bindung möglichst vollständig zu eliminieren. Als Träger des rekombinanten p14-Gens wurde das replikationsdefiziente Adenovirus Ad5 verwendet.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung der Vakzine in der Tumorthherapie beschrieben werden. Untersuchungen angeführter Autoren zur Wirkung anderer Vakzinen, deren Großteil sich ebenfalls auf die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen die viralen Onkogene E6 und E7 konzentriert, verliefen im Tierversuch erfolgreich und führten meist zu einer Regression oder sogar zu einer Abstoßung HPV<sup>+</sup> Tumore. Peptide [86], Fusionsproteine [87,88,89,90], Virus-basierte Impfstoffe [91,92,93], *ex vivo* generierte APC [69,94] und der adaptive Transfer von T-Zellen [95,96,97] wurden bereits in klinischen Studien am

Menschen getestet. Dabei konnten HPV-spezifische CTL nachgewiesen werden. In den meisten Fällen wurde allerdings keine oder nur eine transiente Reduktion des Tumolvolumens beobachtet [69,87,88,89,90,91,94]. Weitere Untersuchungen dazu sowie die fortlaufende Entwicklung im Verständnis der komplexen Interaktionen von Tumoren und Immunsystem und der molekularen Mechanismen, die eine Immunantwort regulieren, erlaubten neuartige immunologische Therapieansätze (Tab 4).

**Tabelle 4: Mit Immuntherapie kombinierte Strategien zur Verbesserung einer zellulären anti-Tumorantwort.** Modifiziert nach Igney [52]

- 
- Verwendung kostimulatorischer Zytokine in der Rezeptur des Impfstoffes:
    - mit Einfluss auf APC (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF)),
    - mit Einfluss auf T-Zellen (IL-2, IL-7, IL-12, IL-15)
  - Bestrahlung
  - Chemotherapie
  - Kleine adjuvante Moleküle (Imiquimod)
  - Blockierung koinhibitorischer Signale durch Antikörper:
    - im Tumorgewebe (B7-H1, B7-H4),
    - auf T-Zellen (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* (CTLA-4))
  - Depletion oder Blockierung von T<sub>reg</sub>
  - Blockierung immunsuppressorischer Zytokine durch Antikörper (TGF- $\beta$ , VEGF)
- 

Gegenwärtig werden verschiedene Strategien miteinander kombiniert, um einerseits effektiv Tumor-spezifische T-Zellen zu aktivieren und andererseits immunsuppressive Faktoren im Tumorgewebe zu reduzieren [98]. Tumore wurden zum Beispiel mit einer Kombination aus Vakzinierung und Radio- oder Chemotherapie behandelt. Auch kleine adjuvante Moleküle wurden mit einer Impfung kombiniert. Imiquimod, ein Nukleosidanalogue aus der Familie der Imidazole, welches eine inflammatorische Antwort über die Bindung der *Toll-like*-Rezeptoren 7 und 8 aktiviert und normalerweise als alleiniges Therapeutikum bei der Behandlung von Genitalwarzen eingesetzt wird [99], verbesserte die Aktivierung einer Impfstoff-induzierten Immunantwort [100]. Ebenso wurden Zytokine als Impfstoffadjuvantien verwendet, die eine Immunantwort unterstützen, indem sie die Differenzierung, Aktivierung und Rekrutierung antigen-präsentierender Zellen einleiten oder einzelne T-Zellgruppen direkt beeinflussen. In vorklinischen Studien erhöhte beispielsweise eine subkutane Injektion von GM-CSF am Impfort die Infiltration der nahe gelegenen Lymphknoten mit DC signifikant [101,102]. Kombinationen mit IL-2 [103,104], IL-7, IL-15 [105,106] und IL-12 [107,108] sind

weitere Beispiele, die im Hinblick auf die Verbesserung einer Vakzine-aktivierten Immunantwort untersucht wurden. Die Typ I-Interferone, insbesondere IFN- $\alpha$ , das von verschiedenen Zelltypen des Immunsystems nach Kontakt mit viralen oder bakteriellen Antigenen sezerniert wird und die Aktivierung von CTL, die Antigenerkennung durch Stimulation der Proteindegredation sowie der MHC-abhängigen Präsentation verbessert [109], wurde ebenfalls in verschiedenen Vakzinestudien als Adjuvanz verwendet [110]. Zytokine die vom Tumorgewebe oder umliegenden Zellen sekretiert werden um eine Immunantwort zu supprimieren, wie TGF- $\beta$  [111,112], wurden in einigen Impfstudien durch spezifische Antikörper blockiert [113,114]. Eine zusätzliche Kostimulation über Moleküle wie CD80 und CD86 verbesserte die Immunantwort gegen Tumorantigene [115,116]. Koinhibitorische Moleküle wie B7-H1 [117,118] und CTLA-4 [119,120] wurden in alternativen Strategien mit spezifischen Antikörpern blockiert. In verschiedenen weiteren Ansätzen verbesserte sich die T-Zellantwort, da neben der Vakzinierung regulatorische T-Zellen durch spezifisch bindende Antikörper blockiert (*Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor-Related Protein*; GITR [121,122,123,124,125]) oder deletiert (CD4/CD25 [126,127]) wurden. Diese Zellen stellen eine kleine Subpopulation von CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T-Zellen dar, die normalerweise Autoimmunantworten [128,129], aber auch Tumor-spezifische Immunantworten regulieren [130,131,132,133]. Insbesondere in der Therapie HPV-assoziiierter Tumorerkrankungen wurden bisher DNA-Impfstoffe mit beispielsweise einer Radio- oder Chemotherapie [134,135], verschiedenen Zytokinen, wie GM-CSF [136] und IL-12 [137] oder einer folgenden Behandlung mit einer adenoviralen Vakzine kombiniert [138]. Des weiteren wurden Hitzeschockproteine, die normalerweise bei zellulärem Stress exprimiert werden und den Abbau nicht mehr funktionsfähiger zellulärer Proteine über das Proteasom beschleunigen, mit HPV-Onkogenen in DNA-Impfstoffen [139] oder Adeno-assoziierten Vektoren appliziert [140] oder mit HPV-Proteinen fusioniert [141]. Peptidimpfstoffe wurden mit verschiedenen Kostimulanzen wie zum Beispiel 4-1BB-Ligand [142], CpG-Oligonukleotiden [143], mutiertem Choleratoxin [144] oder GM-CSF [145] versetzt um eine HPV-spezifische Immunantwort zu steigern. Auch die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Vakzine Ad-p14 sollte mit verschiedenen Strategien kombiniert werden, um zu klären, ob und wie eine Tumorregression dadurch verstärkt wird. Die Vakzinestudien sollten in speziellen Modellsystemen durchgeführt werden.

#### 1.4 Tiermodelle für die Evaluierung von Tumorthérapien

Vorklinische Untersuchungen von neu entwickelten Tumorthérapien werden meist in speziell für diese Fragestellung etablierten Tiermodellen untersucht. Häufig werden dazu syngene Mäuse, wie C57BL/6- oder BALB/c-Mäuse verwendet, die nach Applikation von Zelllinien Tumore ausbilden. Diese Zelllinien, die meist speziell für diese Anwendung hergestellt werden, tragen dann die Merkmale der humanen Tumore, auf welche eine Therapie ausgerichtet werden soll. Oft eingesetzte Zelllinien sind die Lymphomzelllinien EL-4 [146] und RMA, die Brustkrebszelllinie EMT6/AR1 [147] oder die Adenokarzinomzelllinie MC-38 [148]. Transgene Mausmodelle gestatten die Untersuchung molekularer und immunologischer Abläufe bei der Entstehung von Tumoren in festgelegten Geweben, in denen bestimmte Onkogene exprimiert oder bestimmte Tumorsuppressorgene deletiert sind. Solche Modelle wurden zum Beispiel für Brustkrebs [149], Leukämie [150] oder Kolonkarzinome [146] etabliert. Speziell für immunologische Fragestellungen wurde eine transgene Maus entwickelt, die das humane HLA-A\*0201-Molekül auf ihren Zelloberflächen exprimiert [151]. In diesem Modell kann zum Beispiel die Wirkung spezifischer T-Zellen auf durch humanes HLA-A2 präsentierte Antigene untersucht werden. Parallel zu Tiermodellen werden therapeutischer Agenzien oft auch *in vitro* an Zelllinien aus humanen Tumorgeweben getestet. Zu den bekanntesten Zelllinien gehören die aus Brustkrebsgewebe isolierten MCF-7-Zellen [152], die aus Prostatakrebsgewebe isolierten PC3-Zellen [153] oder die Leukämiezelllinien THP-1 [154] und T2 [155]-[156]. In Mausstämmen mit schwerem kombinierten Immundefekt wie *Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency* (NOD-SCID) [157] oder SCID Beige [158], die keine funktionellen T- und B-Zellen ausbilden, kann transplantiertes humanes Gewebe vital erhalten und expandiert werden. In diesen immuntoleranten Mausstämmen lässt sich auch das Auswachsen humaner Tumore reproduzieren und Untersuchungen zur Wirkung von Tumorthérapien durchführen [159]. Derzeit gibt es Xenotransplantationsmodelle für die häufigsten humanen Krebserkrankungen, wie Brustkrebs [160], Leukämie [161,162,163], Kolonkarzinom [164,165], Hals- und Rachentumore [166], Prostatakrebs [167,168] und Ovarialkarzinom [169,170].

HPV-Tumorthérapien werden am häufigsten in C57BL/6-Mäusen untersucht, in denen sich aus den HPV<sup>+</sup> Epithelzelllinien C3 und TC1 Tumore entwickeln. C3-Zellen exprimieren das gesamte HPV16-Genom sowie das Ras-Onkogen [171]; TC1-Zellen nur die Onkogene HPV16 E6/E7 und Ras [172]. Das Expressionsniveau der Onkogene unterscheidet sich in

den beiden Zelllinien. In den C3-Zellen wird die Expression der HPV-Gene durch den natürlichen HPV-Promotor und das E2-Protein reguliert, in TC1-Zellen durch einen besonders starken anderen viralen Promotor. Ein weiteres Modell für vorklinische Studien ist die HLA-A\*0201-transgene Maus, für die die beiden HPV<sup>+</sup> Zelllinien TC1/A2 [173] und HLF16 [174] entwickelt wurden. Zur Untersuchung molekularer Mechanismen der Tumorentstehung entwickelt, aber weniger geeignet für immuntherapeutische Strategien, sind transgene K14/HPV16-Mäuse, welche HPV-Onkogene unter der Kontrolle Zelltyp-spezifischer Promotoren exprimieren [175,176]. Andere Tiermodelle, wie das *Cottontail Rabbit Papillomavirus*-Modell erlauben lediglich Einblicke in Infektionsmechanismen von Papillomviren, da es in diesen Modellen selten zur Entstehung von Dysplasien kommt [177]. Obwohl die Histopathologie der Entstehung von Zervixkarzinomen in weiblichen Rhesusaffen der im Menschen ähnlich ist, ist ein solches Modell auch aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen für frühe Studien zum Potential Tumor-therapeutischer Impfstoffe ungeeignet. Neue Therapiekonzepte werden derzeit überwiegend mit wenigen humanen Tumorzelllinien wie HeLa [178] oder CaSki [179] geprüft. Xenotransplantationsmodelle in NOD-SCID-Mäusen wurden bisher nur mit HPV-infizierten Keratinozyten etabliert und ermöglichen Untersuchungen zum HPV-Infektionszyklus. Humanisierte Mausmodelle mit Zervixkarzinomen zur Untersuchung von Tumorthapien sind bisher nicht etabliert.



## 1.5 Fragestellung

HPV-assoziierte Tumore sind aufgrund ihrer viralen Merkmale im Sinne von Neoantigenen ein besonders geeignetes Ziel immuntherapeutischer Strategien. Impfstoffe zur Aktivierung einer HPV-spezifischen zellulären Immunantwort wurden bereits in Tiermodellen untersucht und zeigten Reduktionen, in vielen Fällen auch eine Zerstörung von Tumorgewebe. Impfstudien im Menschen waren dagegen bisher erfolglos; zwar wurde die Aktivierung einer spezifischen zellulären Immunantwort beobachtet, das Tumorstadium blieb jedoch unbeeinflusst.

Um diese Diskrepanz zu verstehen, nutzt die vorliegende Arbeit die immunologischen Eigenschaften der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten HPV-Vakzine Ad-p14 in vorklinischen Studien. Im Einzelnen ergaben sich dazu die folgenden Fragestellungen:

- (1) Werden durch eine Vakzinierung mit Ad-p14 HPV-spezifische CTL aktiviert?
- (2) Inwiefern beeinflusst eine Vakzinierung mit Ad-p14 die Entwicklung der HPV<sup>+</sup> Tumore?
- (3) Beeinflussen neben CTL auch andere Zellen der adaptiven Immunität den Wachstumsverlauf der Tumore?
- (4) Kann die Vakzine-aktivierte Immunantwort durch eine Kombination mit Immunmodulatoren so reguliert werden, dass suppressorische Mechanismen überwunden, blockiert oder abgeschaltet und Tumore letztlich vollständig zerstört werden?

Zur Beantwortung dieser Fragen gliedert sich die vorliegende Arbeit in drei Teile.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden diese Fragestellungen in einem geeigneten Tiermodell in C57Bl/6-Mäusen bearbeitet, die unter Verwendung der HPV<sup>+</sup> Zelllinien C3 und TC1 Tumore entwickeln. Gezielte Untersuchung und Charakterisierung der T-Zellantworten, sowie der Tumorgewebe sollten aufklären, ob CTL und andere Zellen der adaptiven Immunität die Entwicklung der Tumore beeinflussen. In weiterführenden Vakzinestudien sollte analysiert werden, inwiefern sich die Vakzine-aktivierte Immunantwort durch eine Kombination mit Immunmodulatoren so regulieren lässt, dass Tumore in den Mäusen letztlich vollständig zerstört werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Wirkung von Ad-p14 im Menschen untersucht werden. *In-vitro*-Immunisierungen von humanen Lymphozyten sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich auch beim Menschen mit der Ad-p14-Vakzine funktionelle HPV-spezifische CTL aktivieren lassen. Gleichzeitig und unabhängig davon sollte in

humanen Tumorgewebe untersucht werden, inwieweit CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder auch andere T-Zellen an der Kontrolle HPV-assoziiierter Tumorerkrankungen, insbesondere humaner Zervixkarzinome beteiligt sein können.

Um analog zum reinen Mausmodell den Einfluss von *in vitro* Ad-p14-aktivierten HPV-spezifischen humanen CTL auf die Entwicklung primärer menschlicher Zervixkarzinome untersuchen zu können, lag der Schwerpunkt im dritten Teil auf der Etablierung eines humanisierten Mausmodells.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma	Katalognummer
AB-Plasma	Deutsches Rotes Kreuz	-
Beriglobin	ZLB Behring	22840331H
Brefeldin A	Sigma-Aldrich	B7651
Bradford Reagenz	Bio Rad	500-0203
Bis[sulfosuccinimidyl]-Suberat (BS <sup>3</sup> )	Thermo Scientific	21585
Rinderserumalbumin	Biomol	9048-46-8
CaCl <sub>2</sub>	Roth	CN93.1
CaCl <sub>2</sub>	Roth	P017.2
Cell Line Nucleofector Kit T	Lonza	VCA-1002
Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza	VCA-1003
Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE)	Invitrogen	C34554
Kollagenase	Serva	17449
Dako REAL™ Detection System, Alkalische Phosphatase (AP)/RED, Rabbit/Mouse	DakoCytomation	K5005
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase (POD)/Diaminobenzidin (DAB)+, Rabbit/Mouse	DakoCytomation	K4010
Dendritic Cell Kit	Lonza	VPA-1004
DIFCO Agar-Noble	BD Biosciences	214220
DMEM	Gibco	31966-047
DMEM/F12	Gibco	11320074
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	D2438
DNase	Biozym	170001
Dithiothreitol	Roth	6908.1
Dual-Luciferase-System	Promega	TM040
ECL plus Reagenz	Amersham	RPN2132
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12362
Eosin	Sigma-Aldrich	2853-100ML
Ethanol	J.T.Baker	8006
Far Red (FR)	Invitrogen	C34553
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen	10106-169
Ficoll-Paque-Lösung	GE Healthcare	17-1440-03
Flow DMEM	Sigma-Aldrich	56436C-50L
Isofluran (Forene)	Abbott	-

Bezeichnung	Firma	Katalognummer
G418	Calbiochem	345812
Glycerol	Sigma-Aldrich	G5516
Hämatoxylin	DakoCytomation	S3309
Heparin	B/Braun	Klinikmaterial
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich	H-3537
Imiquimod	Invivogen	tlrl-Imq
Ketanest-S	Pfizer Pharma	-
KHCO <sub>3</sub>	Roth	P748.1
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	G-7513
Milchpulver	Roth	T145.1
Mini Plasmid Purification Kit	Qiagen	12125
Na <sub>2</sub> [ <sup>51</sup> Cr]O <sub>4</sub>	Amersham	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Roth	8563.1
Na <sub>2</sub> -Ethyldiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth	8043.1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth	P030.1
NaCl	Roth	P029.2
NaN <sub>3</sub>	Roth	K305.1
NH <sub>4</sub> Cl	Roth	5470.1
Phosphat-gepufferte KochsalzlösungPBS	Biochrom	L1825
Polyethyleimin	Sigma-Aldrich	-
Benzylpenicillin-Procaïn (10.000 U/ml), Dihydrostreptomycin (10.000 µg /ml) (Pen Strep)	Gibco	15140
Permeabilizing Solution 2	BD Biosciences	
Polymerase, Ligase, Dephosphatase, Klenow-Fragment	Biozym	-
Protein-A-Sepharose	Qiagen	311802
QIAexpressionist (Ni-NTA Spin Kit)	Qiagen	31314
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs	-
IFN-α (Roferon)	Roche	B2001
RPMI 1640	Gibco	72400-054
Natrium-Dodecylsulfat	Roth	CN30.3
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth	AE15.2
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100-100ML
Trypanblau	Bichrom	L6323
Trypsin/EDTA (0,5/ 0,2%)	Biochrom	L2143
Tween 20	Roth	9127.1
Xylazine	Bayer	-
Xylol	Roth	97131
Zytokine: IL-4, GM-CSF, IL-1β, IL-6, TNF-α , PGE2, IL-2	Immunotools	-

### 2.1.2 Peptide

**Tabelle 5: Peptide.** (CMV pp65) Phosphoprotein 65 des Cytomegalie-Virus, (HIV pol) Protease, Reverse Transkriptase, Integrase des HIV, (IMP) Matrixprotein 1 des Influenza-A-Virus, \* Einbuchstabencode

Bezeichnung	Sequenz*	Firma
CMV pp65 (495–503)	NLVPMVATV	Biosyntan
HIV pol (510–518)	ILKEPVHGV	Biosyntan
HPV16 E6 (11-19)	KLPQLCTEL	HU-Berlin/Biochemie
HPV16 E6 (29-37)	TIHDIILEC	HU-Berlin/Biochemie
HPV16 E7 (11–20)	YMLDLQPETT	Biosyntan
HPV16 E7 (7-15)	TLHEYMLDL	HU-Berlin/Biochemie
HPV18 E6 (13-21)	KLPDLCTEL	HU-Berlin/Biochemie
HPV18 E6 (36-44)	KTVLELTEV	HU-Berlin/Biochemie
HPV18 E7 (7-15)	TLQDIVLHL	HU-Berlin/Biochemie
IMP (58–66)	GILGFVFTL	Biosyntan

### 2.1.3 Antikörper und Tetramere

**Tabelle 6: Antikörper für die immunhistochemische Analyse.** (h) Mensch, (m) Maus, (r) Ratte, (g) Ziege, (rab) Kaninchen, (d) Esel; \*Freundlicherweise von Prof. Dr. Piddar Jansen-Dürr (Abt. Molekular- und Zellbiologie, Institut für Biomedizinische Altersforschung, Öster. Ak. der Wissenschaften, Innsbruck) zur Verfügung gestellt.

Antigen	Isotyp	Verdünnung	Klon	Firma	Katalog-Nr.
hCD3	mIgG <sub>1</sub> , κ	1 :25	UCHT1	DakoCytomation	-
hCD4	mIgG <sub>1</sub> , κ	1:25	1F6	Novocastra	-
hCD8	mIgG <sub>1</sub> , κ	1:100	C8/144B	DakoCytomation	M7103
hEGF Pharm Dx	mIgG <sub>1</sub> , κ	gebrauchsfertig	2-18C9	DakoCytomation	K1492
hFoxP3	rIgG <sub>2a</sub> , κ	1:500	PCH101	eBioscience	11-4776
hKi-97	mIgG <sub>1</sub> , κ	1:100	MIB-1	DakoCytomation	IS626
HLA-ABC	mIgG <sub>2a</sub> , κ	1:100	W6/32	DakoCytomation	M0736
HLA-DP, DQ, DR	mIgG <sub>1</sub> , κ	1:100	CR3/43	DakoCytomation	M0775
hp16INK4a	mIgG <sub>1</sub> , κ	gebrauchsfertig	E6H4	CINtec	9511
HPV16E7	mIgG	1:50	-	*	-
mCD4	rIgG <sub>2b</sub> , κ	1:100	GK1.5	eBioscience	14-0041
mCD8	rIgG <sub>2a</sub> , κ	1:100	53-6.7	eBioscience	14-0081
mFoxP3	rIgG <sub>2a</sub> , κ	1:100	FJK-16s	eBioscience	14-5773
mIgG-HRP	gIgG	1:200	-	DakoCytomation	E0466
rIg-HRP	rabIgG	1:200	-	DakoCytomation	E0468
rIg-HRP	dIgG	1:200	-	Dianova	712-065-150

**Tabelle 7: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse.** (h) Mensch, (m) Maus, (r) Ratte, Allophycocyanin, (FITC) Fluoreszinoisothiocyanat, (PE) R-Phycoerythrin; (PerCP) Peridinin Chlorophyllprotein; \*Freundlicherweise von Prof. Matthias Dürst (Gynäkologische Molekularbiologie, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Friedrich Schiller Universität, Jena) zur Verfügung gestellt.

Antigen	Markierung	Verdünnung	Klon	Firma	Katalognummer
mH2-Db	FITC	1:100	KH95		553573
mH2-Kb	PE	1:100	AF6-88.5		553457
hCD4	PerCP	1:5	SK3	alle BD Biosciences	345770
hCD8	Allophycocyanin	1:20	SK1		345775
hCD83	PE	1:5	HB15e		556855
hCD86	FITC	1:5	2331		555657
hGITR	/	1:10	110416	R&D Systems	MAB2177
hIFN- $\gamma$	FITC	1:100	B27	BD Biosciences	554700
hHLA-A2	/	1:100	HB82	Prof. M. Dürst*	/
m/rFoxP3	FITC	1:10	FJK-16s	eBioscience	11-5773
mCD4	Allophycocyanin	1:100	RM4-5		553051
mCD8	PE	1:100	53-6.7	alle BD Biosciences	553032
mGITR	/	1:100	DTA-1		558213
mIgG2b	FITC	1:100	pAK	Immunotools	22339913
mIL-10	PE	1:100	JES5-16E3		554467
mINF- $\gamma$	FITC	1:100	XMG1.2	alle BD Biosciences	554411
rIg	FITC	1:00	G53-238		554016

**Tabelle 8: Antikörper in Tierversuchen. (m) Maus, (r) Ratte**

Antigen	Isotyp	Klon	Firma	Katalognummer
mCD4	rIgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	GK1.5	BD Biosciences	553727
mGITR	rIgG <sub>2b</sub> , $\lambda$	DTA-1	BD Biosciences	558213
rIgG	rIgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	A95-1	BD Biosciences	556968

**Tabelle 9: Antikörper für den Western Blot.** (h) Mensch, (m) Maus, (g) Ziege

Antigen	Isotyp	Verdünnung	Klon	Firma	Katalognummer
Flag-Tag	mIgG <sub>1</sub>	1:4000	M2	Sigma-Aldrich	F1804
hIgG	mIgG <sub>2a</sub>	1:1000	5RE9	Santa Cruz	sc-134340
His-Tag	mIgG <sub>1</sub>	1:1000	AD1.10	R&D Systems	MAB050
HPV16E7	mIgG <sub>1</sub>	1:1000	ED17	Santa Cruz	sc-6981
mIgG-HRP	gIgG	1:5000	-	Santa Cruz	sc-2005

**Tabelle 10: HLA-A2-Tetramere für die durchflusszytometrische Analyse.** Freundlicherweise von der Firma Orpegen\* und von Prof. Stefan Stefanovic (Immunologie / Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen)# zur Verfügung gestellt.

Epitop	Spender	Markierung	Herkunft
E7 (11-20)	HPV16	PE	*
M1 (58-66)	IMP	PE	#
pp65 (495-503)	CMV	PE	#

### 2.1.4 Zelllinien und Kulturmedien

Für die Kultivierung der Zellen wurden folgende Medien eingesetzt: Adhärente Zellen wurden in A-Medium (DMEM, 1% Pen Strep, 10% FCS) kultiviert, in T2-Medium (DMEM, 1% Pen Strep) kurzzeitig gelagert und in E2-Medium (DMEM, 20%FCS, 10% Dimethylsulfoxid) eingefroren. Suspensionszellen wurden in S-Medium (RPMI, 1% Pen Strep, 10% FCS) kultiviert, in T1-Medium (RPMI, 1% Pen Strep) kurzzeitig gelagert und in E1-Medium (RPMI, 20% FCS, 10% Dimethylsulfoxid) eingefroren. Primäre Zellen, wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), wurden in P-Medium (RPMI, 10% AB-Plasma, 1% Pen Strep) kultiviert. DC wurden in D-Medium (CellGro, 1% Pen Strep) generiert und gereift. Die Expression der rekombinanten h/mtGITRL-Proteine durch die Suspensionszelllinie HEK-S erfolgte in Serum-freien HEK-S-Medium (DMEM/F12). B-Zelllinien wurden in BLCL-Medium (RPMI, 10% FCS, 50% B95/8-Zellkulturüberstand, 1 µg/ml Cyclosporin A) hergestellt.

**Tabelle 11: Zelllinien und Kulturmedien.** Freundlicherweise von Prof. Matthias Dürst (Gynäkologische Molekularbiologie Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Universitätsklinikum Jena)\*, Prof. Rudolf Tauber (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin)# und Dr. Jan ter Schegget (Medizinisches Zentrum Universität Leiden)\*\* zur Verfügung gestellt.

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Merkmale</b>	<b>Kulturmedium</b>
C3	Dr. J. ter Schegget**	HPV16 immortalisierte primäre Mausfibroblasten (C57BL/6)	A-Medium
EL-4	LCG Standards, ATCC	9,10-diMethyl-1,2-Benzanthrazen induzierte Lymphomzelllinie (C57BL/6)	S-Medium
HEK-293T	John Hopkins Special Collection, ATCC	Adenovirus Typ 5 transformierte, neuronale Zelllinie (früher als humane embryonale Nierenzellen bezeichnet),	A-Medium
HEK-S	Prof. R. Tauber#	in Suspension wachsende Linie der HEK-293	HEK-S-Medium
K562	LCG Standards, ATCC	Zelllinie einer humanen myelogenen Leukämie, MHC1-Deletion	S-Medium
K562-A2	AG Kaufmann	Stabile Zelllinie für das Transgen HLA*0201	S-Medium
SiHa	LCG Standards, ATCC	Zervikale Plattenepithelkarzinomzelllinie	A-Medium
SiHa-A2	Prof. M. Dürst*	Stabile SiHa-Zelllinie für das Transgen HLA*0201	A-Medium
T2	LCG Standards, ATCC	Humane Lymphoblastenlinie, Antigenpeptid-Transporter-Defizienz	S-Medium
TC-1	John Hopkins Special Collection, ATCC	c-Ha-ras und HPV16-E6/7 immortalisierte primäre Mausfibroblasten (C57BL/6)	A-Medium

### 2.1.5 Tierstämme

Die Mausstämme C.B-17/lcrHsd-Prkcd<sup>scid</sup> Lyst<sup>bg</sup> (SCID beige) und C57BL/6 (Black 6) wurden von der Firma Charles River bezogen. Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité gehalten und durch eine Isofluran-Inhalation getötet (Tierversuchsvorhaben G0189/05, A4811).



### 2.1.6 Menschliches Untersuchungsmaterial

*Buffy Coats* wurden vom Deutschen Roten Kreuz der Berliner Niederlassung bezogen. Das Alter der Blutspender lag zwischen 18 und 60 Jahren. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMC aus den *Buffy Coats* angereichert. Der HLA-0201\*-Status der Spender wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse ermittelt. Die primären Zervixkarzinomproben wurden von der gynäkologischen Abteilung der Charité, Campus Benjamin Franklin zur Verfügung gestellt. Für die Entnahme der Proben lag ein Ethikvotum vor. Die frisch entnommenen Tumormaterialien wurden in T2-Medium aufgenommen und bei Raumtemperatur gelagert. Innerhalb von zwei bis fünf Stunden wurde das Tumormaterial für die Klassifizierung und die Transplantationsversuche aufgearbeitet. Die Art der primären Tumore wurde anhand einer Begutachtung primären Tumormaterials nach den üblichen Verfahren durch Ärzte der Pathologie klassifiziert. Der HPV-Typ von primären Tumoren und Xenotransplantaten wurde durch eine Multiplexgenotypisierung bestimmt [180]. Dazu wurde zunächst DNA aus kryokonservierten Tumormaterialien isoliert. Die DNA-Proben wurden anschließend als Template bei einer GP5<sup>+</sup>/6<sup>+</sup>-Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, bei der ein Fragment aus dem HPV L1-*Open Reading Frame* mit einer Größe von 150 bp amplifiziert wurde. Anhand der Amplifikate wurden die HPV-Typen in einem *Bead*-basierenden Hybridisierungstest bestimmt.

### 2.1.7 Immuntoxin SA2E

Das SA2E ist ein neuartiges chimeres Immuntoxin, dessen Zielstruktur der Rezeptor des epithelialen Wachstumsfaktors (EGF) auf Tumorzellen ist. Das Protein wurde im Rahmen der Etablierung eines humanisierten Mausmodells mit EGFR<sup>+</sup> Zervixkarzinomen getestet. Es besteht aus dem humanen EGF, dem Pflanzentoxin Saporin aus *Saponaria officinalis*. Ein Peptidadapter verbessert die Aufnahme in die Zelle, verhindert den Austritt aus dem Zytosol und detoxifiziert es [181,182,183]. Das Immunprotein SA2E wurde für die Versuche im Xenotransplantationsmodell freundlicherweise vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité zur Verfügung gestellt. Die Durchführung der Versuche ist im Methodenteil dargelegt.

### 2.1.8 DNA-Fragmente in Plasmiden und adenoviralen Vektoren

**Tabelle 12: Plasmide und Adenoviren.** Ursprung der Promotoren der aufgelisteten Plasmide: (hFerL) human Ferritin L, (hFerH) Human Ferritin H, (NFκB) Nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen, Resistenzen: (Amp) Ampicillin, (Kan) Kanamycin, (Hyg) Hygromycin, (Neo) Neomycin, (GFP) grün fluoreszierendes Protein, (GAPDH) Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, (TNC) Tenascin \*Die verwendeten Adenoviren gehen ursprünglich aus den Ad5-Viren hervor und besitzen eine Deletion der Adenovirusgene E1 und E3.

Bezeichnung	Transgen	Transgenpromotor	Resistenz	Herkunft (Referenz)
Ad-GFP*	GFP	CMV	Amp	AG Uckert
Ad-lacZ*	lacZ	CMV	Amp	AG Uckert
Ad-p14*	p14	CMV	Amp	AG Cichon
p16E6/E7	HPV16E6/7	CMV	Amp	AG Cichon
p16E7	ubi, HPV16E7	CMV	Kan	AG Kaufmann
p18E6/E7	HPV18E6/7	CMV	Amp	AG Cichon
pc	-	CMV	Amp	AG Cichon
pCMV	ubi, CMVpp65	CMV	Kan	AG Kaufmann
pCMV-hGITR	hGITR	CMV	Amp	AG Kaufmann
pCMV-mGITR	mGITR	CMV	Amp	AG Kaufmann
pc-p14	p14	CMV	Amp	AG Cichon
phGAPDH-2	hGAPDH	CMV	Amp	AG Loddenkemper
phGITR-L	His-Tag, hIgG-Fc, Flag-TNC, hGITR-L (50-177)	CMV	Amp	AG Kaufmann
phIgG	His-Tag, hIgG-Fc,	CMV	Amp	AG Tauber
pHRLnull	Renilla Luziferase	CMV	Amp	AG Tauber
pHTLV-hGITR	hGITR	HTLV	Amp	AG Kaufmann
pHTLV-mGITR	mGITR	HTLV	Amp	AG Kaufmann
pMCS2	-	hFerL, hFerH	Hyg	Invivogen
pMCS2-dsRedE	ubi, dsRed	hFerL, hFerH	Hyg	AG Kaufmann
pMCS2-GFP-16E7	GFP/ HPV16E7	hFerL, hFerH	Hyg	AG Kaufmann
pMCS2-GFP-CMV	GFP/ CMVpp65	hFerL, hFerH	Hyg	AG Kaufmann
pmGITR-L	His-Tag, hIgG-Fc, Flag-TNC, mGITR-L (50-177)	CMV	Amp	AG Kaufmann
pNFκB-Luci	Firefly Luziferase	NFκB	Amp	AG Kramer
pp14	Ubiquitin, p14	CMV	Kan	AG Kaufmann
p-ras	Ej-ras	CMV	Amp	AG Leutz
pSec-hGITR-L	Flag-TNC, hGITR-L (50-177)	CMV	Neo	AG Kaufmann
pSec-mGITR-L	Flag-TNC, mGITR-L (50-177)	CMV	Neo	AG Kaufmann
pUbiHA	Ubiquitin,	CMV	Kan	AG Kaufmann

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte (Tab 12) wurden mit Hilfe des Programmes Vector NTI (Invitrogen) erstellt. Die molekularen Klonierungen wurden nach den aktuellen Standardprotokollen durchgeführt [184,185]. Für die Klonierungen wurden die üblichen Enzyme verwendet (Polymerase, Ligase, Phosphatase, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme). Die Plasmide wurden in chemisch kompetenten Bakterien (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ; Invitrogen) vermehrt. Die Plasmide wurden qualitativ und quantitativ mit gebrauchsfertigen Lösungen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [184] präpariert. Die für Klonierungen erforderlichen Fragmente wurden mit vorgegebenen Primern und den entsprechenden Templates in einer PCR mit der ProofStart DNA Polymerase in einem Cyler (Mastercycler; Eppendorf) nach Standardprotokollen [184] synthetisiert. Die Richtigkeit der Amplifikationsprodukte, sowie der aus den Klonierungen resultierenden Plasmid-Konstrukte wurden mittels Gelelektrophorese (BioRad) und Sequenzierung (MWG) überprüft.

## **2.2 Genexpressionsanalyse**

### **2.2.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese**

Reife und unreife DC wurden 24 h und 48 h nach Transduktion mit Adenoviren Ad-14 oder Ad-lacZ (*Multiplicity of Infection* (MOI) 300) pelletiert. Aus dem Zellpellet wurde mit Hilfe des RNA-Extraktionskits (RNeasy Mini Kit, Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers die RNA isoliert. Um eine Kontamination mit DNA auszuschließen, enthielt das Protokoll der RNA-Extraktion einen DNase-Verdau. Die RNA wurde nach Bestimmung der Konzentration (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) in c-DNA umgeschrieben. Die c-DNA-Synthese erfolgte mit dem Omniscript RT-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.2 TaqMan-Polymerasekettenreaktion**

Um die Expression des Transgens p14 nachzuweisen, wurden die cDNA-Proben aus Ad-p14- oder Ad-lacZ-transduzierten DC mit Hilfe einer TaqMan-PCR untersucht. Zur Detektion des p14 wurden die spezifischen Primer p14F CAACgTCACACAATgTTggCTAg und p14A ggAATCTTTgCTTTTgTCCAgATg sowie die Sonde p14TM (6-Carboxyfluorescein)-TgCTTggTACCgTCAACCggAATT— (*Black Berry Quencher*) (TibMolBiol) eingesetzt. Zur Detektion der Expression des

Haushaltsgens GAPDH wurden die Primer und Sonde für humanes GAPDH (Human GAPDH Endogenous Control, VIC/Minor Groove Binder Probe; Applied Biosystems) verwendet. Versuchsansätze und TaqMan-PCR wurden nach den Angaben des Herstellers (StepOnePlus; Applied Biosystems) durchgeführt. Als Standard zur Quantifizierung wurden die Plasmide pCMVp14 und phGAPDH2 beginnend ab einer Menge von  $1 \times 10^7$  Molekülen in jeweils 5 Verdünnungsstufen (1:10) mit den entsprechenden Primern für p14 bzw. die GAPDH parallel mitgeführt. Die Expressionsniveaus beider Parameter wurden in Relation zu den Standardkurven ermittelt und die Expression von p14 zur GAPDH normalisiert.

## **2.3 Darstellung von Proteinen**

### **2.3.1 Anreicherung rekombinanter Proteine**

Rekombinante Proteine wurden über zwei in die Proteinsequenz integrierte spezifische Bereiche, den Fc-Teil von humanem IgG1 und den His-*Tag* gereinigt. Die Anreicherung über den Fc-Bereich erfolgte mittels Protein-A-Sepharose. Die Anreicherung über die His-*Tag*-Sequenz wurde mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Volumen der Proteinproben wurde durch Ultrafiltration (Amicon Ultra-15; Millipore) (15 min, 6.500 rpm/ 7600 g) verkleinert. Die Proteinproben wurden entweder für eine Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt, im Western Blot analysiert oder bei -80°C eingefroren.

### **2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford bestimmt [186,187]. Dazu wurden die Proben, sowie Rinderserumalbumin als Standard mit dem Bradford-Reagenz gemischt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm spektrophotometrisch (SmartSpec Plus; BioRad) bestimmt.

### **2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse**

Für die analytische Darstellung der rekombinanten Proteine wurden von jeder Probe 15 µg Gesamtprotein eingesetzt und in Laemmli-Probenpuffer (0,5% Natrium-Dodecylsulfat; 2,5% Glycerol; 15 mM Tris, pH 8,0) unter nichtreduzierenden oder reduzierenden Bedingungen mit 25 mM Dithiotreitol erhitzt (5 min, 95°C). Homogene denaturierende

Polyacrylamidgele (10%) oder native Polyacrylamidgradientengele (5-15%) wurden mit den Proben beladen. Die Proteine wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen (Hydrobond C+; BioRad) transferiert. Der Proteintransfer wurde mittels kurzzeitiger Ponceau-Färbung (Sigma) der Nitrozellulosemembranen überprüft.

Um unspezifische Antikörperbindungen auf den Membranen einzuschränken, wurden diese in Blockpuffer (PBS; 0,05% Tween 20; 5% Milchpulver) inkubiert (30 min). Antikörper wurden in Blockpuffer verdünnt. Die Inkubationszeit des primären Antikörpers betrug 2 h, die des sekundären Antikörpers 1 h. Vor und nach einer Antikörperinkubation wurden die Membranen mit Waschpuffer (PBS; 0,05% Tween 20) gewaschen. Die Bindung der Antikörper wurde durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht (CL-XPosure Film; Thermo Scientific).

#### **2.3.4 Stabilisierung von Proteinen durch chemische Vernetzung**

Proben mit einer Proteinmenge von 200 ng der verschiedenen rekombinanten Proteine wurden mit dem chemischen Vernetzungsmolekül Bis[sulfosuccinimidyl]-Suberat (BS<sup>3</sup>) in einem Gesamtvolumen von 40 µl auf Eis inkubiert (30 min; (13)). Die Vernetzung wurde durch Zugabe von 2 µl Tris-HCl (1 M, pH 7.5) gestoppt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und im Western Blot analytisch dargestellt.

### **2.4 Zellbiologische Methoden**

#### **2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank (HERASafe; Kendro) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden in einem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank (Heraeus BBD6220; Kendro) bei 37°C inkubiert.

Die Vitalität und Zelldichte der Zellkulturen wurde nach einer Trypanblaufärbung (0,5% Trypanblau in PBS) in einer Neubauer-Zählkammer (Labor Optik) bestimmt. Suspensions-, sowie Monolayer-Zellkulturen wurden in Abhängigkeit von ihrer Proliferationsrate mit neuem Medium versorgt und passagiert.

Zur Passage adhärenter Zellkulturen wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit Trypsin/ EDTA (0,5/ 0,2%) behandelt und die abgelösten Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Suspensionszellkulturen wurden zur Passagierung abzentrifugiert (5 min, 1.200 rpm/ 260 g) und das Zellpellet in neuem Kulturmedium resuspendiert.

Zum Einfrieren wurden Zellsuspensionen in Einfrierröhrchen (1,5 ml Kryoröhrchen; Nunc) 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss in Einfrierbehältern (Nalgene) bei  $-80^{\circ}\text{C}/-150^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Röhrchen kurzzeitig bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert, bis in den Zellsuspensionen nur noch ein gefrorener Kern verblieb. Die Zellsuspensionen wurden in vorgekühlte Röhrchen überführt, tropfenweise mit Kulturmedium gemischt, zweimal mit Kulturmedium gewaschen (5 min, 1.200 rpm/260 g) und in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und kultiviert.

#### **2.4.2 Transformation von B-Zellen**

B-Zellen wurden durch Transduktion mit EBV-Partikeln aus dem Überstand der Zelllinie B95/8 immortalisiert [188,189]. Dazu wurden 2 bis  $5 \times 10^6$  PBMC in BLCL-Medium aufgenommen und über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen in Gegenwart von Cyclosporin A kultiviert.

#### **2.4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen**

Der Gentransfer in eukaryotische Zellen wurde mit der für die jeweiligen Zelllinien oder Primärzellen effektivsten Transfektionsmethode durchgeführt.

Um adhärente Zelllinien zu transfizieren wurde die Methode der Kalziumphosphatpräzipitation verwendet [184]. Zellen ( $8 \times 10^5$ ) wurden in 3 ml Kulturmedium in ein *Well* einer 6-*Well*-Platte eingesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde DNA (18  $\mu\text{g}$ ) in Wasser (Endvolumen 135  $\mu\text{l}$ ) verdünnt und mit  $\text{CaCl}_2$  (15  $\mu\text{l}$ ; 2,5 M) gemischt. Langsam und unter Bewegung wurde der Transfektionspuffer (1% HEPES; 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 270 mM NaCl; 10 mM KCl, pH 6,75) dazugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde auf einen 70-80% konfluenten Zellrasen getropft und 6 h im Feuchtbrutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert bevor das Medium durch frisches Medium ersetzt wurde.

Die Suspensionszelllinie HEK-S wurde durch Verwendung von Polyethylenimin transfiziert [184]. Dabei wurde die DNA zunächst zu gleichen Teilen oder im Verhältnis 1:2 mit Polyethylenimin in einem Volumen, das 1/10 des Gesamtkulturansatzes entsprach, vorinkubiert (10 min) und dann in die Zellkultur geträufelt.

Andere Suspensionszelllinien und primäre Zellen wurden durch Elektroporation mit der Amaxa-Technologie (Lonza) nach den Angaben des Herstellers transfiziert (Tab. 13).

Für eine stabile Transfektion mit einer anschließenden Klonierung wurde den Zellkulturmedien der HEK-293T-Zellen 24 h nach der Transfektion 0,5 mg/ml G418 zugesetzt. Nach 14 Tagen wurden die entstandenen Kolonien vorsichtig mit Trypsin abgelöst und getrennt weiter kultiviert. Die Zellen ausgewählter Klone wurden vermehrt und konserviert.

**Tabelle 13: Bedingungen für die Elektroporation mit der Amaxa-Technologie.**

Zelltyp	Nukleofektion	
	Kit	Programm
B-LCL	T	U01
DC	Dendritic cell	U2
K562	V	T16
K562-A2	V	T16
EL-4	V	C09

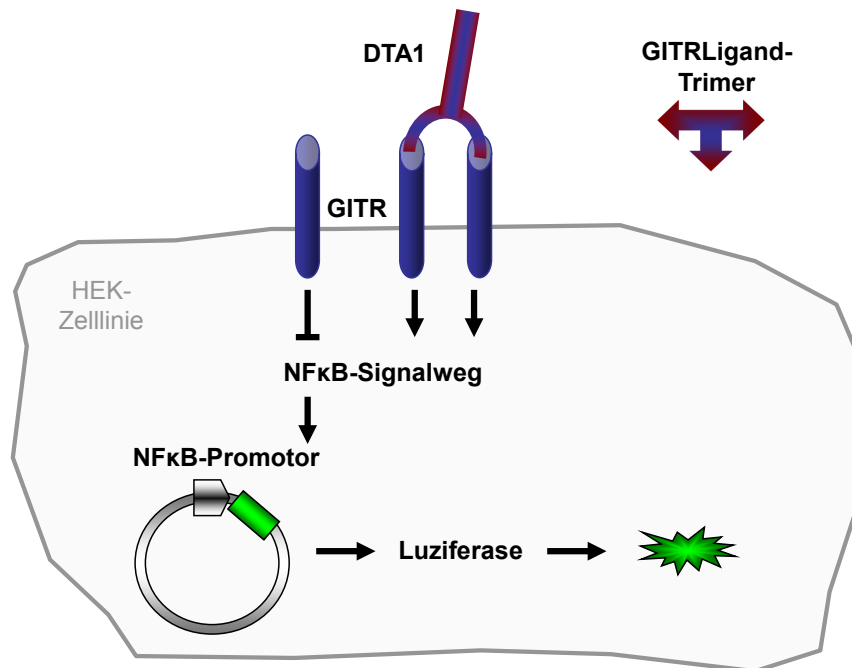
#### 2.4.4 Onkogenitätstest im Weichagar

Transformierende Eigenschaften der exprimierten rekombinanten Gene führen zum Adhärenzverlust der Monolayerkultur und damit zur Proliferation der Zellen im Weichagar [190]. Die Onkogenität ergab sich aus der Anzahl makroskopisch sichtbarer Ansammlungen der Zellen, den so genannten Foci, im Vergleich zur Anzahl eingesetzter Zellen.

Die zu untersuchenden Konstrukte wurden in Kombination mit einem Reporterkonstrukt mittels Kalziumphosphatpräzipitation in NIH3T3-Zellen eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden anschließend selektioniert (0,5 mg/ml G418). Die Transfektionseffizienz wurde anhand der Reporterexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Kulturflasche wurde 1:1 mit Kulturmedium (2 x Flow DMEM, 7,4 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20% FCS, Pen Strep, 4 mM Glutamin, 1 mg/ml G418) und mit Weichagar 0,3% (DIFCO-Agar-Noble) gefüllt. Dazu wurde 1 ml Zellsuspension gegeben und gut gemischt. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde zuvor auf 100 bis 1.000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Die Kulturflasche wurde in Eiswasser inkubiert (15 min) und anschließend kultiviert. Die Onkogenität wurde aus der Anzahl der Foci, welche innerhalb von vier Wochen makroskopisch sichtbar waren, und der zuvor gemessenen Transfektionseffizienz errechnet.

### 2.4.5 Nachweis der Aktivierung des *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-cells* (NFκB)-Signalweges

Die Funktionalität der rekombinanten mtGITRL-Proteine wurde anhand der Aktivierung des NFκB-Signalweges, welche aus der Interaktion von GITR und seinem Liganden resultiert, bestimmt. Dazu wurde ein Plasmid verwendet, welches eine Luziferase unter der Kontrolle des NFκB-Promotors codiert und eine Zelllinie, die den GITR auf ihrer Oberfläche exprimiert (Abb. 5).



**Abbildung 5: Nachweis der Aktivierung des NFκB-Signalweges.** Die Bindung an den stabil transfizierten GITR auf der Oberfläche der Zelllinie aktiviert den NFκB-Signalweg. Dies führt zur Expression des auf dem transient transfizierten Plasmid codierten, unter der Kontrolle des NFκB-Promotors stehenden Luziferasegens.

Für die Herstellung dieser Zelllinie wurden HEK-293T-Zellen mit dem GITR-Konstrukt (pCMV-mGITR, pHTLV-mGITR, pCMV-hGITR oder pHTLV-hGITR) stabil transfiziert und kloniert. Die HEK-293T-Zelllinie mit der stärksten GITR-Expression wurde für diese Versuche verwendet und mit den beiden Luziferase-Reporter-Plasmiden pHRLnull und pNFκB-Luci (1:10) mittels Kalziumphosphatpräzipitation transfiziert und über Nacht inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde mit einer Konzentration von 2 µg/ml der rekombinanten Proteine oder Kontrollproteine angereichert und für weitere 16 h bis 48 h inkubiert. Die Stärke der Aktivierung durch die rekombinanten Proteine wurde über die Luziferaseaktivitäten mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Kits im Luminometer (Lumat LB 9507; Berthold Technologies) bestimmt.



#### **2.4.6 Isolierung primärer Tumorzellen der Maus**

Die Haut um einen Tumor wurde mit einer Schere eröffnet und präpariert. Die Tumorkapsel wurde vorsichtig herausgelöst, mit 70% Ethanol gespült und in PBS gewaschen. Das Tumorgewebe wurde 10 min mit Skalpellen (Scalpel No.11; Feather) in einer Kulturschale zerschnitten. Das zerkleinerte Gewebe wurde in 5 ml Lösung A (RPMI; 10% FCS; 1 mg/ml Collagenase; Trypsin) aufgenommen und über Nacht bei 0°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10 min, 1.200 rpm/ 260 g) und das Pellet in 5 ml Lösung B (Lösung A, 1 mg/ml DNase) resuspendiert und geschüttelt (5-10 min, 37°C). Große Zellverbände wurden mit einer Pipette entfernt, die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 min, 1.200 rpm/ 260 g, 0°C) und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in A-Medium aufgenommen, in Kulturflaschen überführt und kultiviert.

#### **2.4.7 Isolierung von Milzzellen der Maus**

Der Bauchraum des Tieres wurde über der linken Flanke eröffnet. Die Milz wurde vorsichtig herauspräpariert und 3-4 Mal mit T-Medium gewaschen. Die Milz wurde in 3 ml T-Medium überführt und mit dem gentleMACS Dissociator (Programm 01.01. m-spleen; Miltenyi Biotech) zerkleinert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 2 ml ACK-Puffer (150 mM NH<sub>4</sub>HCl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 100 µM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2-7,4) für 90 sec inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit S-Medium auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (5 min, 1.500 rpm/ 400 g). Das Zellpellet wurde erneut in S-Medium resuspendiert und durch einen Filter (70 µm; Greiner) gegeben. Die gefilterten Zellen in S-Medium wurden mit einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  /ml in Kulturflaschen überführt und kultiviert.

#### **2.4.8 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut**

*Buffy Coats* wurden zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. Jeweils 35 ml dieser Zellsuspension wurden über 15 ml Ficoll-Paque-Lösung geschichtet und zentrifugiert (25 min, 2.200 rpm/ 870 g, ohne Bremse). Der Überstand der Gradientenzentrifugation [191] aus Plasma und PBS wurde abgesaugt, die Interphasen mit den PBMC gesammelt und drei Mal in PBS gewaschen (10 min, 1.200 rpm/ 260 g; 15 min, 900 rpm/ 150 g;

10 min, 1.500 rpm/ 400 g). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen eingefroren oder direkt für weitere Experimente verwendet.

#### **2.4.9 Generierung und Reifung dendritischer Zellen**

DC wurden aus Monozyten isolierter PBMC nach einem modifizierten Protokoll [192] generiert. Dazu wurden  $5 \times 10^7$  PBMC in 5 ml D-Medium in eine Zellkulturschale ( $\varnothing$  10 cm) ausgesät und 2 h inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken in Suspension gebracht und der Überstand abgenommen. Diese Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen und entweder direkt weiter kultiviert oder eingefroren.

Die adhärenenten Zellen, zu denen dendritische Vorläuferzellen, Makrophagen und eine geringe Zahl an T-Zellen, B-Zellen und Blutplättchen gehörten, wurden mit 5 ml D-Medium und 1.000 U/ml IL-4 sowie 1.000 U/ml GM-CSF in Kultur genommen. Nach drei Tagen wurden 2 ml D-Medium mit IL-4 und GM-CSF dazugegeben. Nach weiteren drei Tagen wurden die unreifen DC geerntet und über Nacht durch Zugabe von 250 ng/ml IL-1 $\beta$ , 25.000 U/ml IL-6, 250 ng/ml TNF- $\alpha$  und 25  $\mu$ g/ml PGE2 ausgereift. Diese DC wurden vor der Beladung mit den Antigenen drei Mal mit PBS gewaschen.

#### **2.4.10 Dendritische Zellen für die Antigenpräsentation**

Reife DC wurden mit 10  $\mu$ g/ml Peptid in D-Medium 4 h inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurde freies Peptid entfernt. Diese so beladenen DC wurden für die Generierung von T-Zelllinien verwandt, die spezifisch für HLA-A\*0201-restringierte Peptide waren.

In einer anderen Variante wurden  $2 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^7$  unreife DC in 100  $\mu$ l Nukleofektionslösung aufgenommen und mit 1-5  $\mu$ g DNA von Plasmiden für die Antigenpräsentation transfiziert. Die DC wurden in D-Medium mit 250 ng/ml IL-1 $\beta$ , 25.000 U/ml IL-6, 250 ng/ml TNF- $\alpha$  und 25  $\mu$ g/ml PGE2 überführt und über Nacht ausdifferenziert.

Adenovirale Konstrukte wurden vor und nach Ausdifferenzierung der DC eingeführt. Dazu wurden die Zellen für mindestens 6 h in D-Medium mit unterschiedlichen MOI (0, 30, 100, 300, 1000) von Adenoviren inkubiert und anschließend drei Mal mit PBS gewaschen. Ausdifferenzierte transduzierte DC wurden zur Generierung spezifischer T-Zelllinien eingesetzt oder bis zur späteren Verwendung eingefroren.

#### **2.4.11 Aktivierung spezifischer zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL)**

Antigen-beladene DC wurden mit PBMC im Verhältnis 1:10 bis 1:30 gemischt und in P-Medium inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Kulturen geteilt und mit der doppelten Menge P-Medium weiter kultiviert. Nach fünf bis neun Tagen wurden die Zellen erneut mit Antigen-beladenen DC in P-Medium mit 10 U/ml IL-2 und 10 U/ml IL-7 vergesetzt. Nach drei bis vier dieser Stimulationszyklen wurde die Reaktivität der CTL untersucht.

#### **2.4.12 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmolekülen und von intrazellulären Zytokinen**

In einer durchflusszytometrischen Analyse wurden Größe, Granularität und spezifische Fluoreszenzmarkierung von Zellen detektiert. Suspendierte Zellen ( $1 \times 10^6$ , 100  $\mu$ l) wurden mit Hilfe Fluorochrom-konjugierter Antikörper in FACS-Puffer (PBS; 1% BSA; 0,1% NaN<sub>3</sub>) gefärbt (30 min, Dunkelheit). Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch Zugabe von humanem Immunglobulin (1 mg/ml) blockiert. Vor der Messung wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Um die Vitalität von Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen, wurden die Zellen mit Propidiumjodid (5  $\mu$ g/ml, 5-10 min) inkubiert [193]. Um markierte Zellen für einen längeren Zeitraum zu fixieren, wurden sie nach der Inkubation mit den Antikörpern 10-20 min in Formalin (2% in PBS) inkubiert.

Zur Identifizierung und Quantifizierung Peptid-spezifischer CTL wurden Tetramer-färbungen in Verbindung mit ebenfalls fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt. Für den Nachweis der Antigen-spezifischen IFN- $\gamma$ -Produktion von CTL wurden Peptid- oder Antigen-beladene Stimulatorzellen mit T-Zellen im Verhältnis 1:10 gemischt und für einen Zeitraum von 4-16 h kultiviert. Zur intrazellulären Anreicherung der Zytokine wurde dem Ansatz in den letzten 4 h der Inkubation Brefeldin A (1  $\mu$ g/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden in Formalin (2% in PBS) fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern für Zelloberflächenmoleküle (CD8-Allophycocyanin, CD4-PerCP) und für Zytokine (IFN- $\gamma$ -FITC) gefärbt. Alle Zellen wurden durchflusszytometrisch (FACS-Calibur mit Software Cellquest Pro; BD Biosciences) bewertet.

#### 2.4.13 Nachweis der CTL-Aktivität durch Chromfreisetzung

Im Chromfreisetzungstest (CRA) wurde die Lyse radioaktiv markierter Zielzellen (*Targets*) durch CTL (*Effectors*) über in den Kulturüberstand freigesetztes radioaktiv markiertes Chrom bestimmt [194].

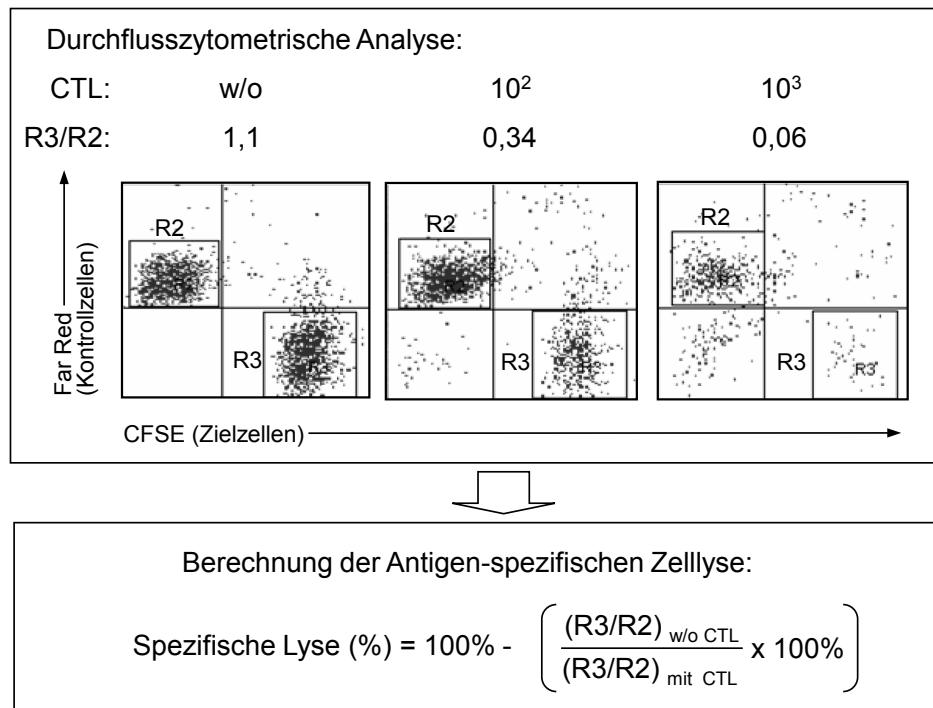
Dazu wurden Zielzellen ( $1 \text{ bis } 2 \times 10^6$ ) in FCS mit  $\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$  (300 mCi, 2 h, Amersham) beladen und anschließend  $5 \times 10^3$  Zielzellen/*Well* mit einer titrierten Anzahl von T-Zellen, verschiedenen Effektor/Zielzell-Verhältnissen (E/T Ratio), in 96-*Well*-Platten mit V-Boden 4 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen (Skatron-Filter-System; Skatron) und die radioaktive Strahlung innerhalb einer Minute bestimmt (Gamma Counter; LKB Wallac). Der Anteil spezifisch freigesetzten Chroms wurde wie folgt berechnet:  $\text{Prozentzahl spezifischer Chromfreisetzung} = (\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100\% / (\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})$ . Die maximale Freisetzung wurde aus dem Überstand von Zielzellen nach Zugabe von 1% Triton X-100 bestimmt. Messungen mit einer spontane Freisetzung  $<20\%$  der maximalen Freisetzung wurden in die Ergebnisse einbezogen.

#### 2.4.14 Nachweis der CTL-Aktivität im VITAL-FR-Test

Im VITAL-FR-Test wurde die durch CTL herbeigeführte spezifische Lyse von Zielzellen im Verhältnis zu einer Kontrollzellpopulation gemessen [195]. Voraussetzung ist die Kenntnis immundominanter Peptide in einem definierten HLA-Kontext. Die Antigenpeptid-Transporter-defiziente Zelllinie T2, welche sich sehr effektiv mit HLA\*0201-restringierten Peptiden beladen lässt, wurde als Ziel- und Kontrollzelllinie verwendet.

Zur Differenzierung der beiden Populationen wurden die Zielzellen ( $1 \times 10^6$ ) mit  $10 \mu\text{M}$  CFSE und die Kontrollzellen mit  $5 \mu\text{M}$  Far Red (FR) für 5 min in T1-Medium inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von 20% FCS gestoppt und die Zellen in S-Medium gewaschen. Die Zielzellen wurden über Nacht mit den relevanten und die Kontrollzellen mit irrelevanten Peptiden ( $10 \mu\text{g/ml}$ , in T1-Medium mit 3% FCS/  $3 \mu\text{g/ml}$   $\beta$ 2-M) beladen. Die Effektoren wurden titriert (96-*Well*-Platten mit V-Boden), mit  $1 \times 10^3$  Zielzellen und  $1 \times 10^3$  Kontrollzellen pro *Well* ( $200 \mu\text{l}$  S-Medium,  $10 \text{ U/ml}$  IL-2) gemischt und für 72 h kultiviert. Danach wurden die Zellsuspensionen durchflusszytometrisch bewertet (Abb. 6). Die Peptid-spezifische Lyse wurde aus den Verhältnissen der Anteile in den *Gates* R3 und R2 der Kontroll- bzw. Zielzellen nach folgender Formel berechnet:

$100\% - [(R3/R2)_n / (R3/R2)_{ko}] \times 100\%$ . Dabei wurden die Ergebnisse aus Messungen fluoreszierender Zellen mit einer definierten Anzahl (n) an Effektoren  $(R3/R2)_n$  mit Messungen der Kontrollen (ko) ohne Effektoren verglichen  $(R3/R2)_{ko}$ .

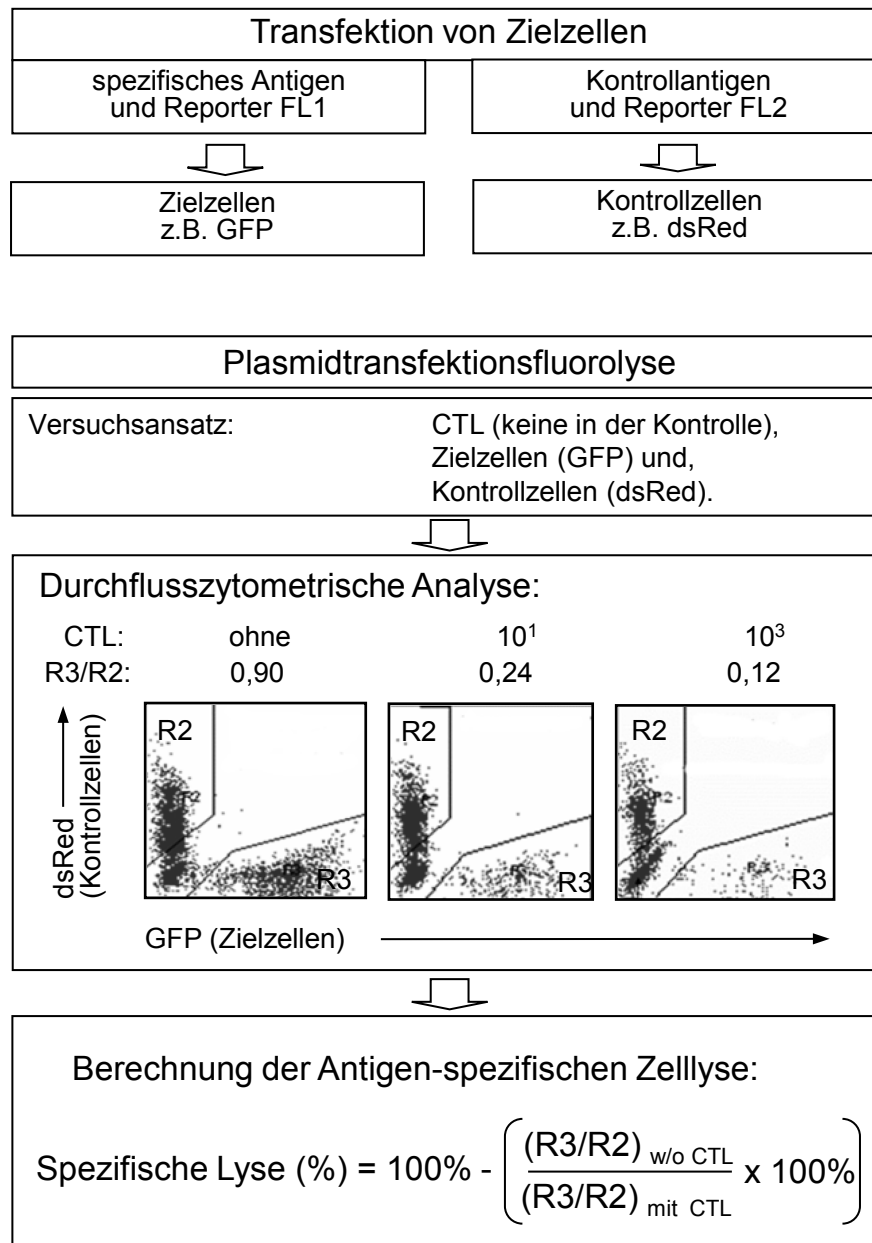


**Abbildung 6: Durchflußzytometrische Auswertung im VITAL-FR-Test.** Die Kontroll- und Zielzellpopulation wurde in einem *Live Gate* im *Forward/Side Scatter* ausgewählt und in einem *Dot Plot*-Fenster mit den Bereichen FI-1 (CFSE)/FI-4 (Far Red) gemessen. Im *Gate* R3 wurden die Anzahl CFSE<sup>+</sup> Zielzellen detektiert, im *Gate* R2 die Anzahl der Far Red<sup>+</sup> Kontrollzellen. Die Effektorzellpopulation stellte sich als ungefärbte Zellwolke dar.

#### 2.4.15 Plasmidtransfektionsfluorolyse

In der PTF wird wie im VITAL-FR-Test die durch CTL herbeigeführte Lyse aus dem Verhältnis von unterschiedlich mit Antigenen beladenen Zielzellen zu Kontrollzellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb 7). Im Unterschied zum VITAL-FR-Test ist dieser Test nicht auf die vorherige Kenntnis der interagierenden Strukturen beschränkt und verschiedene, auch autologe Zellen sind als Ziel- bzw. Kontrollzellen zugänglich. Zielzellen werden mit einem Plasmid transfiziert, das neben der Sequenz für das ubiquitinierte Antigen für ein GFP kodiert und Kontrollzellen mit einem Plasmid, welches die Sequenzen eines irrelevanten Proteins und des rot fluoreszierenden dsRed codiert. In den Plasmiden stehen Antigen und Marker unter der Kontrolle eines Promotors und sind durch eine selbstspaltende 2A-Sequenz verbunden. Dadurch wird eine optimale proteasomale Degradation des potentiellen Antigens bei gleichzeitigem Schutz des fluoreszenzierenden

Proteins ermöglicht und die Antigenexpression korreliert direkt mit der Expression des Fluoreszenzmarkers [196].



**Abbildung 7: Durchführung und Auswertung der PTF.**

Mittels Elektroporation transfizierte Zellen wurden über Nacht kultiviert. Die Transfektionsrate wurde über die Fluoreszenzmarker durchflusszytometrisch kontrolliert und lag für optimale Ergebnisse über 50%. Mit Antigenvektor und Kontrollvektor transfizierte Zellen wurden im gleichen Verhältnis gemischt und mit spezifischen T-Zellen titriert (96-Well-Platten mit V-Boden). In Abhängigkeit vom Zelltyp der Ziel- bzw. Kontrollzellen wurden die Ansätze 24-96 h kultiviert. Ansätze ohne CTL dienten als Kontrolle. Die

Antigen-spezifische Lyse wurde wie für den VITAL-FR-Test oben beschrieben durchflusszytometrisch erfasst und errechnet. Dabei wurde das GFP im Fluoreszenzkanal FL-1 und dsRed in FL-2 gemessen.

## **2.5 Tumormodell in der Maus**

### **2.5.1 Transplantation primärer Tumore**

Bei der Transplantation von Tumorgewebeblöcken wurden 8-12 Wochen alte weibliche SCID Beige Mäuse für den Zeitraum des operativen Eingriffs gewichtsabhängig mit Xylazine/Ketamin (1:10) narkotisiert. Der Eingriffsort wurde rasiert und desinfiziert. Durch einen linksseitigen 5-10 mm langen Schnitt wurde eine Hauttasche eröffnet, ein Tumorgewebeblock darin platziert und der Schnitt mit Hautkleber geschlossen.

Für die Transplantation einzelner Tumorzellen wurden Gewebestücke aus primärem Tumormaterial mit Hilfe einer Schere zerkleinert und in 5 ml Medium (DMEM, 1% Pen Strep) aufgenommen. Das Gewebe wurde im gentleMACS Dissociator (2 x Programm 01.01. m-spleen) zerkleinert, die Suspension filtriert (70 µm; BD Biosciences) und pelletiert. Das Zellpellet wurde mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$ /ml in Medium resuspendiert. Weiblichen SCID Beige-Mäusen wurden 200 µl dieser Zellsuspension linksseitig subkutan appliziert.

Zur Transplantation von Tumorzellaggregaten wurden Gewebestücke von Primärtumoren (500 mm<sup>3</sup>) mit Hilfe einer Schere zerschnitten und in 1 ml PBS durch eine Kanüle (20G; BD Biosciences) aufgezogen. Typischerweise enthielten die so gewonnenen Suspensionen Aggregate mit bis zu 20 Zellen und  $1-5 \times 10^6$  Aggregaten pro Milliliter. Jeweils 200 µl dieser Präparationen wurden subkutan in den linken Rückenbereich der Versuchstiere injiziert.

Der Zustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und dabei zunächst makroskopisch die Etablierung und das Wachstum der Transplantate bewertet. Hatten die Tumoren Größen von maximal 1.000 cm<sup>3</sup> erreicht wurden die Tiere getötet, das Tumorgewebe entnommen und retransplantiert. Zusätzlich wurden Proben von Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Lymphknoten und Tumor zur Gewebearbeit asserviert. Für eine Retransplantation wurde das Tumorgewebe wie oben beschrieben aufgearbeitet.

### **2.5.2 Behandlung mit dem Immuntoxin SA2E**

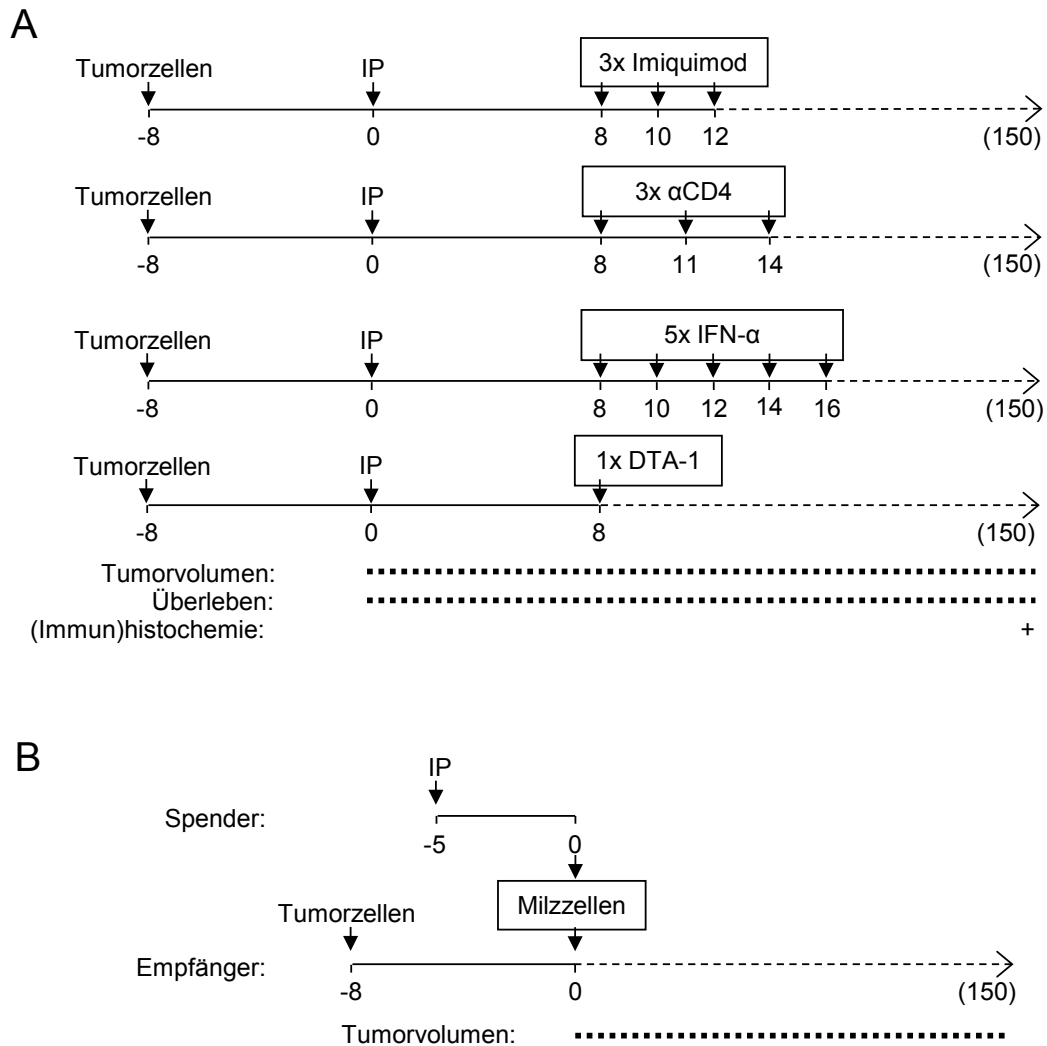
Nach der Transplantation von Tumorzellaggregaten in SCID Beige-Mäuse und bei Tumorumfängen von mindestens 125 mm<sup>3</sup> wurde den Tieren verschiedene Dosen in PBS gelösten SA2E subkutan und tumornah in die linke Flanke appliziert. Diese Gabe erfolgte alle drei Tage und wurde 6 Mal wiederholt. Im Verlauf wurden das Gewicht der Tiere und die Volumina tastbarer Tumoren von außen mit einem Messschieber (Skaliper; AGT) bestimmt.

### **2.5.3 Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen im Tiermodell**

Für Untersuchungen im Tumormodell wurden C57BL/6-Mäusen C3- oder TC1-Tumorzellen ( $1 \times 10^6$ ) subkutan in die linke Leiste appliziert. Zur Aktivierung spezifischer T-Zellen erhielten die Tiere  $1 \times 10^{10}$  infektiöse Partikel (IP) des Ad-p14 oder des Kontrollvirus Ad-lacZ intramuskulär in den rechten Oberschenkel. Die Abbildung 2.4 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf der Versuche mit Immunmodulatoren und transferierten Tumor-spezifischen T-Zellen.

Immunmodulatoren wurden wie folgt pro Zeitpunkt und Tier in PBS intratumoral injiziert: Imiquimod (100 µg), CD4-Antikörper (100 µg) und IFN- $\alpha$  ( $1 \times 10^5$  IU). Der Antikörper DTA-1 (200 µg) wurde einmalig intravenös appliziert (Abb. 8A). Für den Transfer Tumor-spezifischer T-Zellen wurden Spendertiere mit Ad-p14 oder mit Ad-LacZ immunisiert und isolierte mononukleäre Zellen ( $2 \times 10^7$ ) aus der Milz in syngene Tiere mit C3-Tumoren intraperitoneal appliziert (Abb. 8B). In den Versuchen wurde das Tumorumfang alle zwei Tage gemessen.





**Abbildung 8: Schematischer Ablauf der Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen im Mausmodell:** (A) Wirkung von Immunmodulatoren auf die Aktivität in-situ induzierter Tumor-spezifischer T-Zellen. (B) Wirkung transferierter T-Zellen auf das Tumorwachstum. Zeitverlaufsachsen sind angegeben in d (Tage).

## 2.6 (Immun)Histochemische Analyse

Für histologische Untersuchungen wurden Gewebeproben entweder kryokonserviert oder in 5% Formalin fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet [197]. Schnitte (4 µm; Mikrotom HM560; Microm) wurden auf Objektträgern (SuperFrost Ultra Plus; Menzel-Gläser) fixiert und getrocknet: Kryoschnitte 1 h bei Raumtemperatur an der Luft und Paraffinschnitte über Nacht bei 60°C. Die Gewebeschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Gewebestrukturen wurden durch Färbung der Kerne mit Hämatoxylin und des Zytoplasmas mit Eosin unterscheidbar gemacht. Für die Immunhistochemie wurden vor der Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper die Epitope demaskiert (Proteinase K/

Trypsin) und endogene Peroxidasen blockiert. In den Kontrollen wurde kein primärer Antikörper zugesetzt. Entsprechend der Konjugation des Sekundärantikörpers wurden für den Nachweis über die Peroxidase die Umsetzung von 3,3'-Diaminobenzidin (POD/DAB, LSAB/DAB; Dako) bzw. über die alkalischen Phosphatase die Entwicklung eines roten Farbstoffen (LSAB/FastRed; Dako) verwendet. Die Schnitte wurden vor dem Einbetten in nicht-wässrigem Medium (Neo-Mount; Merck) in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mittels Xylol von Paraffinresten befreit. Gefärbte Zellen und Strukturen wurden in der Durchlichtmikroskopie (BH-2, Olympus) bewertet und digitalisiert.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Meßwerte wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Ihre Berechnung und Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel (MS Office, 2003). Für statistische Vergleiche wurde die SPSS Software für Windows (Version 15, SPSS) verwendet.

Um einen signifikanten Unterschied zwischen Frequenzen infiltrierender T-Lymphozyten in Gewebeschnitten zu ermitteln, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Eine spezifischere Analyse erfolgte mit dem  $\alpha$ -abgleichenden Post-Hoc-Test.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 T-Zellantwort und Tumorentwicklung nach Ad-p14-Vakzinierung in Mäusen

##### 3.1.1 Evaluation potentiell transformierender Eigenschaften des p14-Vakzinierungsgens

Ausgangssequenzen für die Herstellung des in dieser Arbeit zu testenden Impfantigens waren die HPV-Onkogene E6 und E7 der HPV-Typen 16 und 18. Um die maximale Sicherheit dieses Vakzinierungsgens zu gewährleisten, waren bei der Auswahl der Sequenzbereiche potentiell transformierende Sequenzen der multifunktionalen Onkogene ausgeschlossen worden. Die verbleibenden 14 Sequenzen wurden entgegen ihrer natürlichen Abfolge miteinander fusioniert. Um transformierende Eigenschaften auszuschließen, wurde das rekombinante p14-Gen neben den Wildtyp-HPV-Onkogenen in einem Weichagar-Test bewertet. Diesem Test ging die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit dem jeweiligen Transgen-exprimierenden Plasmid in Kombination mit einem GFP-Reporterplasmid und Selektion voraus. Die Frequenzbestimmung der GFP<sup>+</sup> Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Die Onkogenität der Transgene ermittelte sich aus der Anzahl der Foci, die sich aus den im Weichagar-Test eingesetzten Zellen bildeten (Tab. 14).

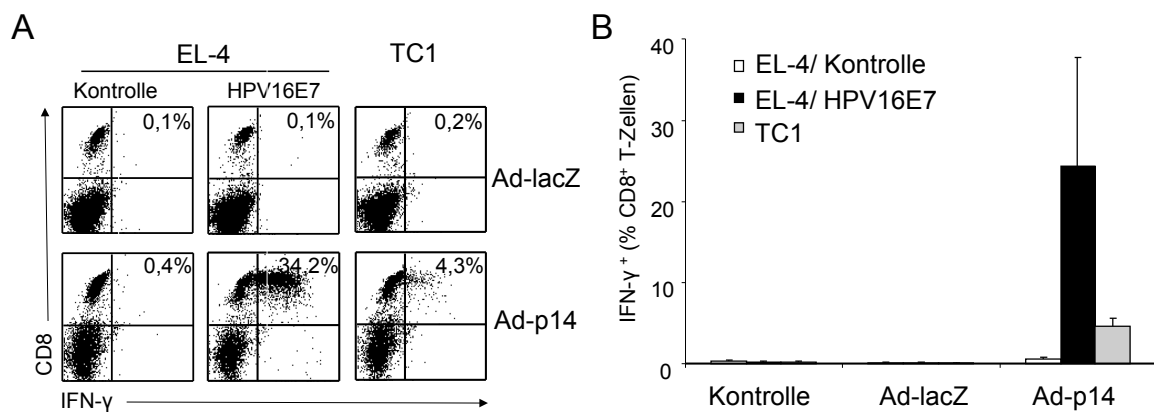
**Tabelle 14: Untersuchung transformierender Eigenschaften von Onkogenen und des p14-Konstrukts.** Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Genprodukt	(ohne)	k-ras	HPV16 E6/E7	HPV18 E6/E7	p14
<b>GFP<sup>+</sup> Zellen (% aller Zellen)</b>	17	39	19	38	21
<b>Foci</b>	0	121	138	21	0
<b>Onkogenität (transformierte Zellen in % aller Zellen)</b>	0	31	66	5,5	0

In den Ansätzen ohne Onkogen wurden keine Foci dargestellt, während bei dem Kontrollonkogen k-ras ein Drittel der Zellen transformiert waren. Die HPV18-Onkogene führten in 5% der Zellen zu einer Foci-Bildung, die mit dem Onkogen HPV-16 transformierten Zellen sogar in zwei Drittel der Zellen. Im Gegensatz dazu wirkte p14 nicht onkogen und war deshalb als Transgen für Vakzinierungsstudien geeignet.

### 3.1.2 Interferon- $\gamma$ -Sekretion HPV-reaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Vor Beginn der Vakzinestudien wurde das p14-Gen in ein geeignetes Gentransfersystem, den adenoviralen Vektor Ad5 eingebracht. Im folgenden Versuch wurde zunächst untersucht, ob eine Impfung mit der Adenovirus-basierten Vakzine eine HPV-spezifische zelluläre Immunantwort, insbesondere CTL aktiviert, die letztendlich zum größten Teil für die Zerstörung von Tumorzellen erforderlich ist. Zur Klärung dieser Frage wurden zunächst C57BL/6-Mäuse mit Ad-p14 oder dem Kontrollvirus Ad-lacZ immunisiert. Um HPV-spezifische CTL nachzuweisen, wurden den Mäusen die Milzen entnommen und in den daraus isolierten Splenozyten, die für aktivierte CTL spezifische Sekretion von IFN- $\gamma$  analysiert (Abb. 9).

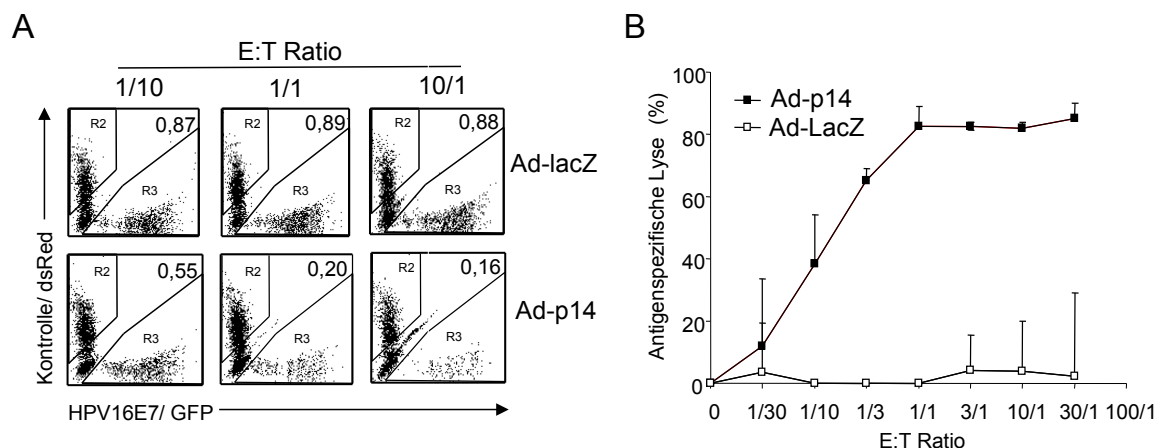


**Abbildung 9: Nachweis HPV-spezifischer CTL über die IFN- $\gamma$ -Sekretion.** Splenozyten von Ad-p14- und Ad-lacZ-geimpften Mäusen wurden mit Stimulatoren (EL-4-Zellen, EL-4/ HPV16E7-Zellen und TC1-Zellen) koinkubiert und die Frequenzen der IFN- $\gamma$ -sezernierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen zytometrisch bestimmt. A) Exemplarische FACS-Analyse einer CD8/IFN- $\gamma$  Antikörperfärbung von Splenozyten einer Ad-lacZ-immunisierten Maus (obere Reihe) und einer Ad-p14-immunisierten Maus (untere Reihe) nach Inkubation mit Stimulatorzellen. Die Anteile von CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen sind für die Beispiele angegeben. B) Graphische Darstellung von drei unabhängigen Versuchen. Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 3

Während in den Versuchsansätzen mit Splenozyten, der mit Kontrolladenovirus Ad-lacZ immunisierten Mäuse, keine signifikante HPV-spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen wurde, lag der Anteil CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen der Ad-p14 behandelten Tiere durchschnittlich bei 25%. Die Verwendung von EL-4/HPV16E7-Zellen als Stimulatoren führte zu einer fünffach höheren Frequenz CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen als die Verwendung von Zellen der HPV16<sup>+</sup> Tumorzelllinie TC1. Im Vergleich zur Kontrolle war die Anzahl Zytokin-sezernierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit TC1-Zellen stimuliert wurden achtfach höher.

### 3.1.3 Zytotoxische Aktivität HPV-reaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Der vorangegangene Versuch zeigte HPV-reaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der spezifischen IFN- $\gamma$ -Sekretion. Der folgende Test untersucht die zytolytische Funktionalität der CTL. Zu diesem Zweck wurden Splenozyten aus den mit Ad-lacZ und Ad-p14 immunisierten Mäusen in einem Zytotoxizitätstest untersucht, der neben den Vakzinestudien im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Die PTF beschreibt die durch CTL herbeigeführte spezifische Lyse Antigen-exprimierender Zielzellen, die durchflusszytometrisch dargestellt wird (Abb. 10).



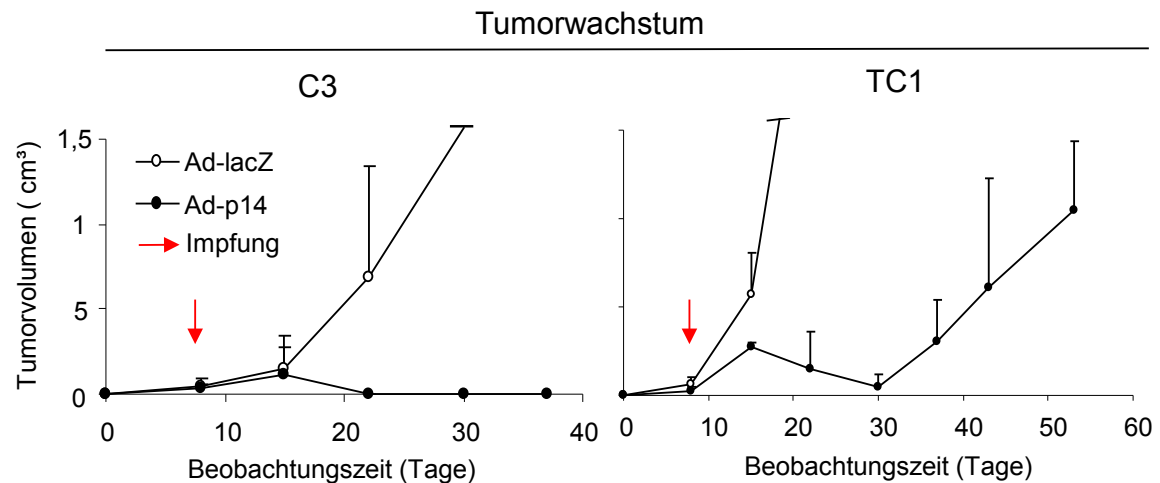
**Abbildung 10: Darstellung der HPV-spezifischen Lyse.** Aus Ad-p14- und Ad-lacZ-immunisierten Versuchstieren wurden Splenozyten isoliert und in der PTF untersucht. A) Exemplarische Darstellung der HPV16E7-spezifischen Lyse in Abhängigkeit der Splenozytenkonzentration. E/T-Ratios sind für die Beispiele angegeben. B) Spezifische Lyse in Abhängigkeit vom E/T-Ratio. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 3$

Splenozyten aus Kontrolltieren, die im vorangegangenen Test kein IFN- $\gamma$  produzierten, zeigten auch in der PTF keine HPV-spezifische Lyse. Im Gegensatz dazu reagierten Splenozyten aus mit Ad-p14 geimpften Versuchstieren mit einer starken spezifischen Lyse, die bei einem E/T-Ratio von 1/10 bereits 40% und bei gleichen Anteilen von Effektor- und Zielzellen 80 bis 90% erreichte. Somit konnten in diesen Versuchen eindeutig HPV-spezifische CTL beschrieben werden, die in Mäusen durch eine Vakzinierung mit Ad-p14 aktiviert wurden.

### 3.1.4 Entwicklung HPV<sup>+</sup> Tumore in Mäusen nach Vakzinierung mit Ad-p14

Für vorklinische Untersuchungen zur Therapie HPV-assoziiierter Tumore wurden die HPV<sup>+</sup> Zelllinien C3 und TC1 verwendet, die in C57BL/6-Mäusen Tumore entwickeln. In vor Beginn dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass Ad-p14

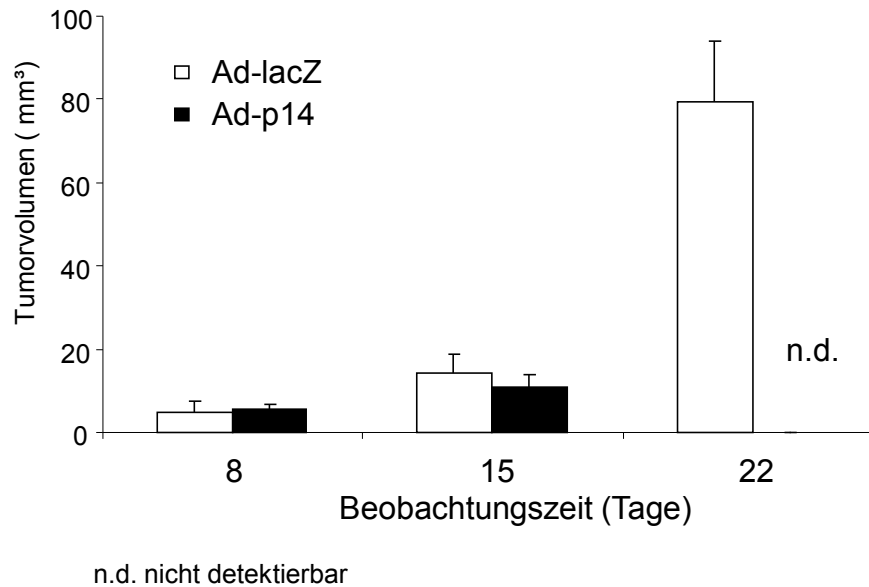
vakzinierter Versuchstiere (10/10) die Zellen der beiden Tumorlinien abstießen und keine Tumore entwickelten [85]. Die prophylaktische Vakzinierung schützte also vor der Tumorentwicklung. Wurden die Tiere erst vakzinert, nachdem sich bereits Tumore aus den Zellen entwickelt hatten, ließ sich in allen Tieren zunächst eine Verkleinerung der Tumore beobachten. Während sich aber im weiteren Verlauf C3-Tumore in den Mäusen vollständig zurückbildeten, wuchsen Tumore, die sich aus TC1-Zellen entwickelten wieder aus (Abb. 11).



**Abbildung 11: Tumorentwicklung nach Vakzinierung zu einem späten Zeitpunkt.** Den Versuchstieren wurden acht Tage vor Immunisierung TC1- oder C3-Zellen appliziert. Tieren der Kontrollgruppe wurde das Adenovirus Ad-lacZ injiziert, den Tieren der Versuchsgruppe das Ad-p14. Das Wachstum der Tumore wurde über einen Zeitraum von 40 Tage verfolgt. Abbildung modifiziert nach Hoffmann [85]. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=10$

### 3.1.5 T-zellabhängige Tumorregression

Im folgenden Versuch wurde überprüft, inwieweit die Tumorabstoßung durch spezifisch reaktive T-Zellen hervorgerufen wird, also T-zellabhängig ist. Dazu wurden Milzzellen aus Ad-p14 und Ad-lacZ vakzinierter Mäusen isoliert und naiven C3-Tumor<sup>+</sup> Mäusen appliziert (Abb. 12).

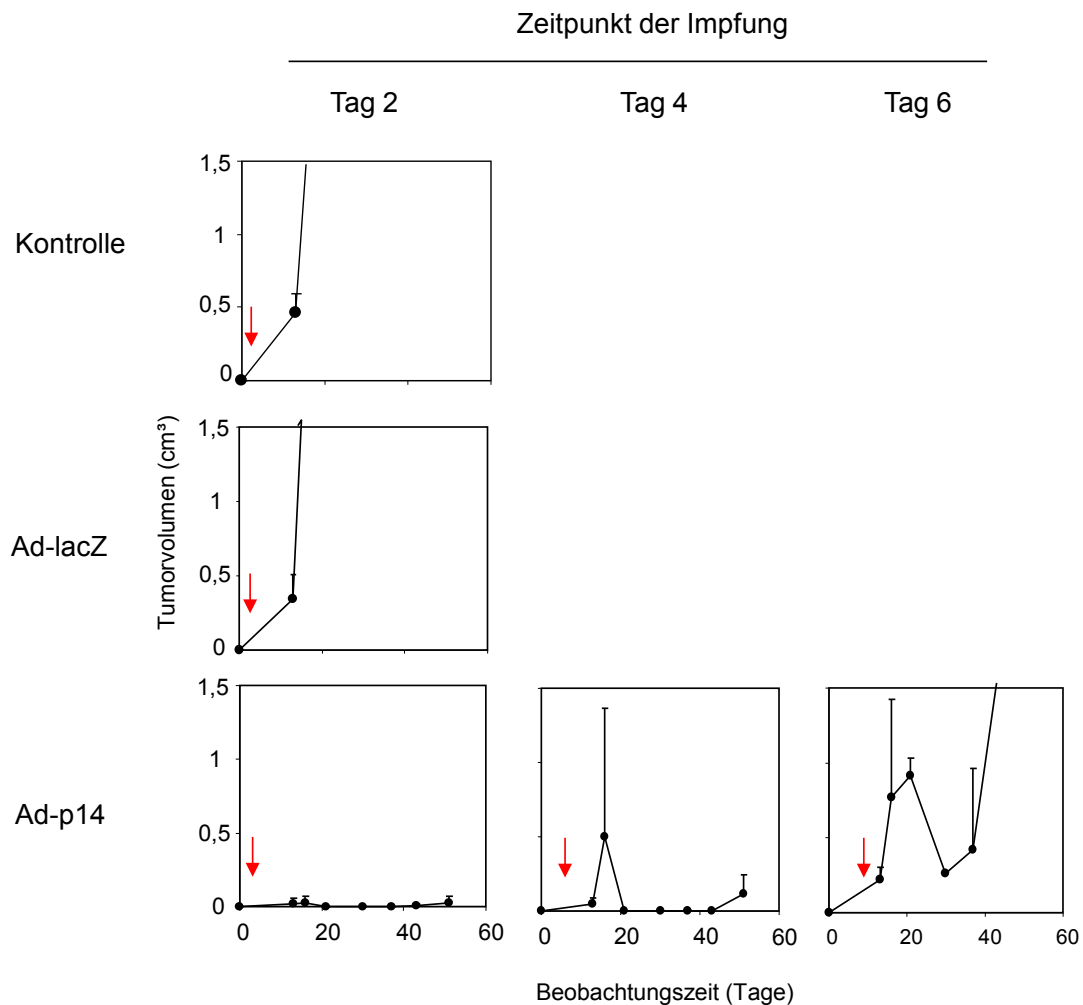


**Abbildung 12: Tumorentwicklung nach Transfer Vakzine-aktivierter CTL.** Versuchstiere wurden mit Ad-lacZ oder Ad-p14 immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Splenozyten entnommen und C3<sup>+</sup> Mäusen intraperitoneal appliziert. Die Volumina der C3-Tumore wurden an Tag 8 vor, sowie an Tag 15 und 22 nach Splenozytentransfer gemessen. Mittelwerte  $\pm$  SD von n=3

Versuchstiere, die Splenozyten aus Ad-lacZ geimpften Mäusen erhielten, entwickelten Tumore, die bis Tag 15 Volumina von 15 bis 18 mm<sup>3</sup> und bis Tag 22 Volumina von 70 bis 90 mm<sup>3</sup> erreichten. Im Vergleich dazu waren die Tumore in den Versuchstieren, die Splenozyten aus Ad-p14 immunisierten Mäusen bekamen an Tag 15, mit Volumina von 13 bis 16 mm<sup>3</sup> kleiner und bildeten sich bis Tag 22 soweit zurück, dass sie makroskopisch nicht mehr nachweisbar waren. Auch nach einem Zeitraum von zwei Monaten wuchsen die Tumore in dieser Gruppe nicht mehr aus. Der Transfer Ad-p14 aktivierter Splenozyten führte in diesem Versuch zu einer kompletten Abstoßung von C3-Tumoren und bestätigte somit den signifikanten Einfluss spezifisch reaktiver T-Zellen bei der Tumorabstoßung.

### 3.1.6 Tumorregression in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer frühen Vakzinierung

Da TC1-Tumore nach einer Vakzinierung zu einem späten Zeitpunkt nicht abgestoßen wurden, sondern in zwei Intervallen auswuchsen, folgte ein Versuch, der den Einfluss einer frühen Vakzinierung mit Ad-p14 auf den Wachstumsverlauf der TC1-Tumoren untersuchte (Abb. 13).



**Abbildung 13: Regression von TC1-Tumoren in Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer Vakzinierung.** Die Ad-p14-Vakzine wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der TC1-Zellinjektion appliziert. Als Kontrolle erhielten Tiere PBS bzw. das Kontrollvirus Ad-lacZ an Tag 2 nach Tumorinduktion. Über einen Zeitraum von 60 Tagen wurden die Tumorgößen am Injektionsort gemessen. Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4)

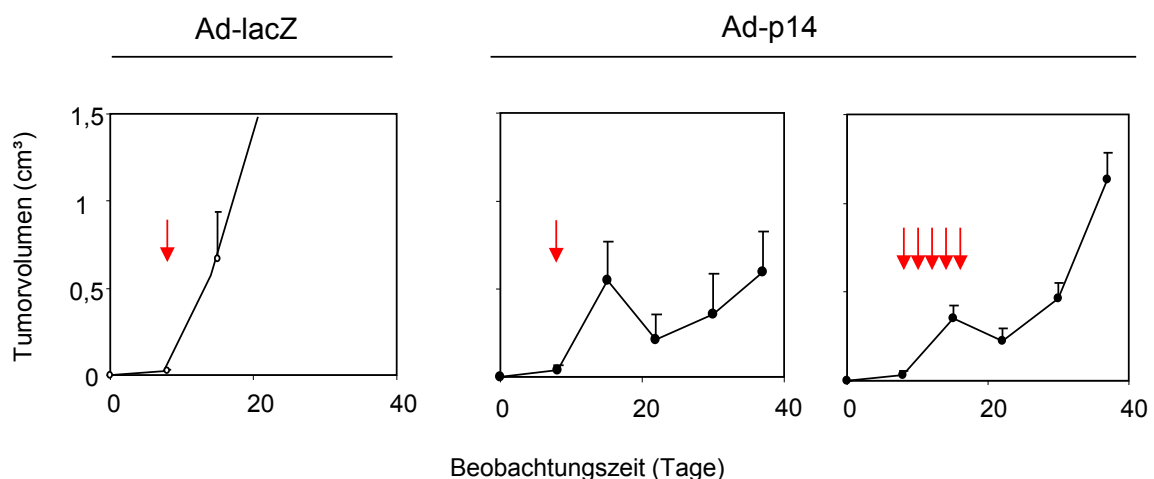
Alle Kontrolltiere, unabhängig davon, ob sie den Träger allein oder das Kontrollvirus Ad-lacZ erhielten, entwickelten Tumore, die bereits an Tag 20 Volumina von 1 cm<sup>3</sup> zeigten und sich sukzessive weiter vergrößerten. Aufgrund dessen wurden diese Gruppen nicht weiter geführt. Die Versuchstiere, die zwei Tage nach TC1-Zellapplikation mit dem Ad-p14 geimpft waren entwickelten hingegen keine sichtbaren Tumore. Die Tumorzellen wurden vollständig abgestoßen. Versuchstiere der an Tag 4 geimpften Gruppe bildeten ebenfalls Tumore, die an Tag 16 Volumina um 1 cm<sup>3</sup> erreichten, in den folgenden vier Tagen aber vollständig regredierten und über einen Zeitraum von 20 Tagen makroskopisch nicht sichtbar waren. Zwei Versuchstiere dieser Gruppe (2/10) entwickelten nach Tag 40 erneut Tumore. Alle Versuchstiere nach Immunisierung an Tag 6 entwickelten Tumore, die sich im Vergleich zu den Tumoren der Kontrolltiere langsamer und in zwei



aufeinanderfolgenden Intervallen vergrößerten, sich jedoch nicht vollständig zurückbildeten. Dieser Versuch verdeutlichte, dass die Vakzinierung mit Ad-p14 zu späten Zeitpunkten das Wachstum der Tumore im Vergleich zu den Kontrollen zwar einschränkte und zu einer zweiphasigen Progression führte, aber die Weiterentwicklung der Tumore nicht verhindern konnte. Eine frühe Immunisierung zwei Tage nach Applikation von Tumorzellen zeigte dagegen eine komplette Regression der Tumore, also eine wirksame Tumor-Vakzinierung mit Ad-p14.

### 3.1.7 Tumorregression nach wiederholter Vakzinierung zu späten Zeitpunkten

Das Ziel des folgenden Experiments bestand darin, den Einfluss einer wiederholten Vakzinierung zu späten Zeitpunkten auf den Wachstumsverlauf von TC1-Tumoren zu untersuchen (Abb. 14).

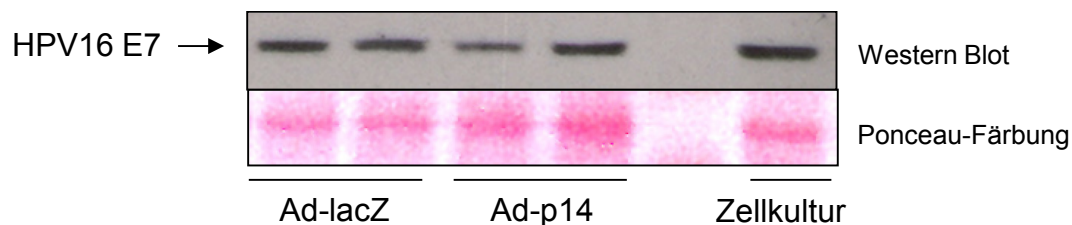


**Abbildung 14: Regression von TC1-Tumoren nach Mehrfach-Immunisierung.** Den Versuchstieren wurden acht Tage vor Immunisierung TC1-Zellen appliziert. Tieren der Kontrollgruppe wurde das Adenovirus Ad-lacZ injiziert, den Tieren der beiden Versuchsgruppen das Ad-p14. Dabei wurde eine Versuchsgruppe einmalig, die andere mehrfach immunisiert - fünf Mal im Abstand von zwei Tagen. Das Wachstum der Tumore wurde über einen Zeitraum von 40 Tage verfolgt. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=4$

Die einfach und mehrfach mit Ad-p14 immunisierten Tiere entwickelten bis Tag 30 Tumore mit Volumina von bis zu 5 mm³. Diese vergrößerten sich in den einfach geimpften Versuchstieren bis Tag 38 auf 6 mm³. In mehrfach immunisierten Tieren waren die Tumore zu diesem Zeitpunkt bereits doppelt so groß. Die wiederholte Impfung führte somit im Vergleich zur Kontrolle zwar zu einer partiellen Regression der Tumore, im Vergleich zur einmaligen Immunisierung wuchsen die Tumore aber schneller.

### 3.1.8 Immunologische Eigenschaften der TC1-Tumore

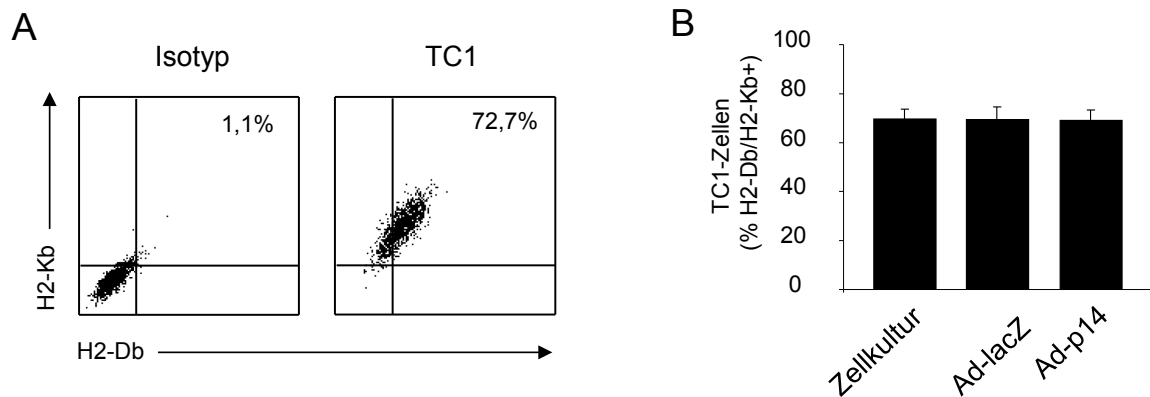
Entwickeln sich nach Ad-p14-Vakzinierung zu einem späten Zeitpunkt *Tumor-Escape*-Varianten, die zum Beispiel durch einen Verlust der Tumor-spezifischen Antigenexpression oder einer verminderten MHC-Klasse I-Expression gekennzeichnet sind und somit ihre Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem einschränken? Zur Prüfung dieser Fragestellung wurden TC1-Zellen aus Tumoren isoliert, die in Mäusen nach Ad-p14-Vakzinierung erneut progredierte. Der Nachweis der Tumor-spezifischen Antigenexpression erforderte den Aufschluss der TC1-Zellen, die Auftrennung der Zellproteine in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die anschließende Analyse im Western Blot (Abb. 15).



**Abbildung 15: Antigenexpression in TC1-Tumorzellen.** Proteine aus TC1-Zellen, die entweder zuvor aus progressiven Tumoren Ad-lacZ- und Ad-p14-vakzinierter Mäuse isoliert oder *in vitro* kultiviert waren, wurden in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und im Western Blot charakterisiert. Dargestellt sind die HPV16 E7-Proteinbanden nach Antikörperfärbung in der Western-Blot-Analyse.

TC1-Zellen aus einer Zellkultur exprimierten das Tumor-spezifische Antigen HPV16E7, welches sich in der Western-Blot-Analyse mit einem Gewicht von 19 kDa darstellen ließ. Auch in TC1-Zellen, isoliert aus den Tumoren Ad-lacZ immunisierter Mäuse, konnte HPV16E7 detektiert werden. Einen Verlust des Tumor-spezifischen Antigens zeigten TC1-Zellen aus den Tumoren der Ad-p14 immunisierten Mäuse nicht, hier war HPV16E7 ebenfalls auf Proteinebene im Zellysatz nachweisbar.

Die Analyse der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen, die für die Präsentation von Epitopen Tumor-spezifischer Antigene auf Zelloberflächen verantwortlich sind, erfolgte durchflusszytometrisch nach Antikörperfärbung der TC1-Zellen (Abb. 16). Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen TC1-Zellen aus Tumoren nach später Ad-p14-Vakzinierung, aus Tumoren Ad-lacZ vakzinierter Mäuse oder TC1-Zellen aus einer Zellkultur. Durchschnittlich waren 70% der gemessenen Zellen positiv für die Maus-MHC-Klasse I-Moleküle H2-Db/H2-Kb.



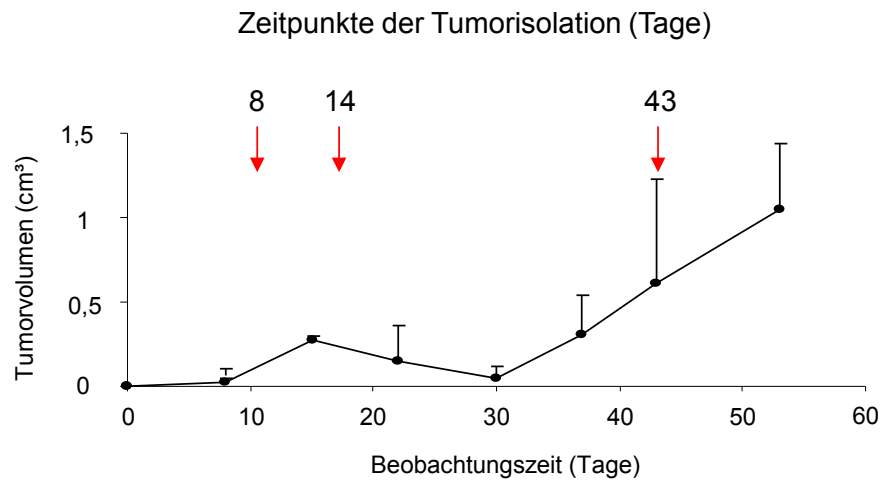
**Abbildung 16: MHC-Klasse I-Expression in TC1-Tumorzellen.** TC1-Zellen aus *in-vitro*-Kulturen und isoliert aus progressiven Tumoren Ad-lacZ- und Ad-p14-vakzinierter Mäuse wurden nach H2-Db/H2-Kb-Antikörperfärbung zytometrisch analysiert. A) Exemplarische FACS-Analyse von TC1-Zellen aus Ad-lacZ- und Ad-p14-immunisierten Tieren. Anteile von H2-Db<sup>+</sup>/H2-Kb<sup>+</sup> Zellen sind für die Beispiele angegeben. B) Anteile von H2-Db<sup>+</sup>/H2-Kb<sup>+</sup> Zellen als Mittelwerte  $\pm$  SD von n=3

In einer weiteren Untersuchung sollte überprüft werden inwieweit die für die Tumorerstörung verantwortlichen T-Zellen in das Tumorgewebe einwandern und ob eine Vakzinierung die Einwanderung der T-Zellen beeinflusst.

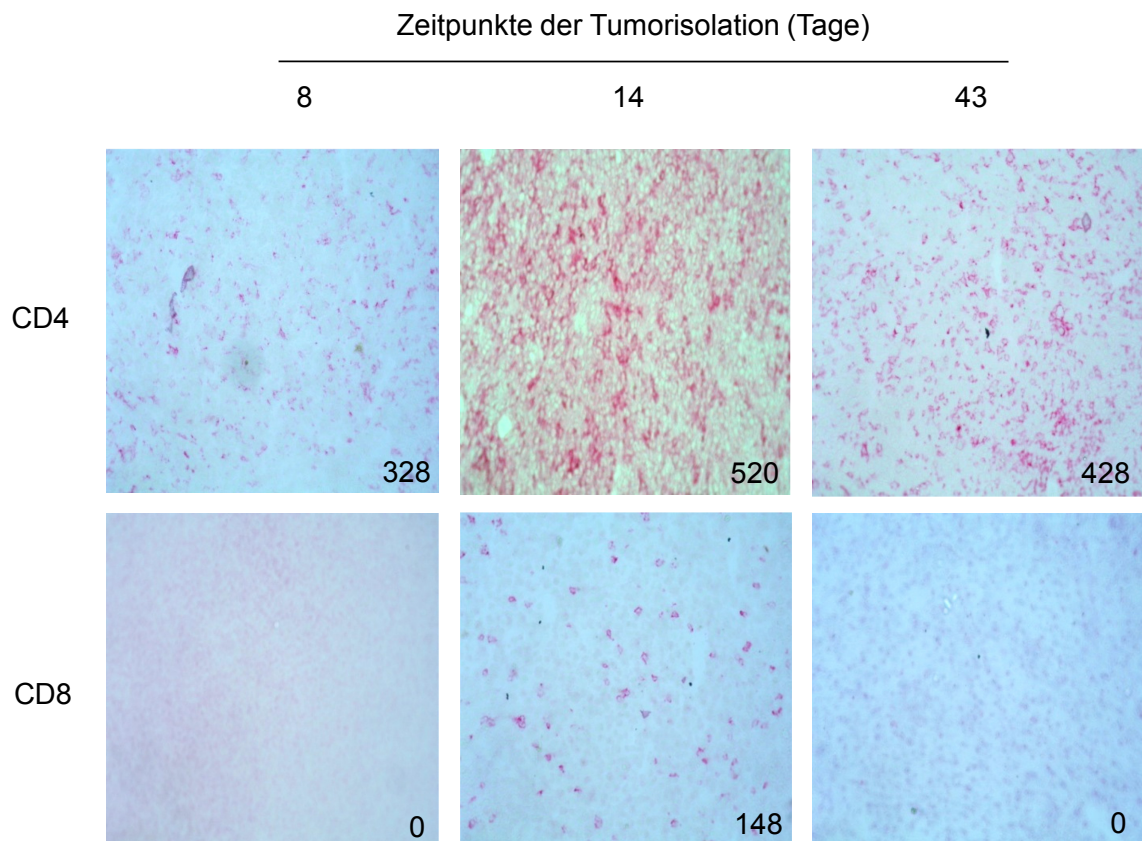
Der Versuch umfasste die Analyse der Tumorgewebe zu drei verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Vakzinierung (Abb. 17). Die Vakzinierung erfolgte 8 Tage nach Tumorsezierung und die Entnahme der Tumorgewebe erfolgte entweder an Tag 8 vor Vakzinierung, an Tag 14, während sich das Tumolvolumen verkleinerte, oder an Tag 43, während das Tumolvolumen erneut zunahm (Abb. 17A).

In Tumoren vor der Vakzinierung (Tag 8) ließen sich keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen sondern ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. Im Vergleich dazu wiesen Tumorgewebe, die während der Regression bzw. kurz nach der Vakzinierung entnommen wurden (Tag 14), fast doppelt so viele CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowie auch eine große Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. In Tumoren, die sich nach der kurzzeitigen Regression wieder vergrößerten (Tag 43), lagen wie in Tumoren vor Vakzinierung nur CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor. Dabei war die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den in Tag 8 isolierten Tumoren um 25% und zu den in Tag 14 isolierten Tumoren um rund 40% geringer. CD8<sup>+</sup> T-Zellen stellten sich auch hier nicht dar. Somit ließ sich ein selektives Wachstum von Tumorvarianten mit Verlust der Antigenexpression oder MHC-Klasse I-Expression ausschließen. Vielmehr war hier die An- oder Abwesenheit Tumor-infiltrierender Lymphozyten entscheidend für das Wachstum der Tumore.

A



B



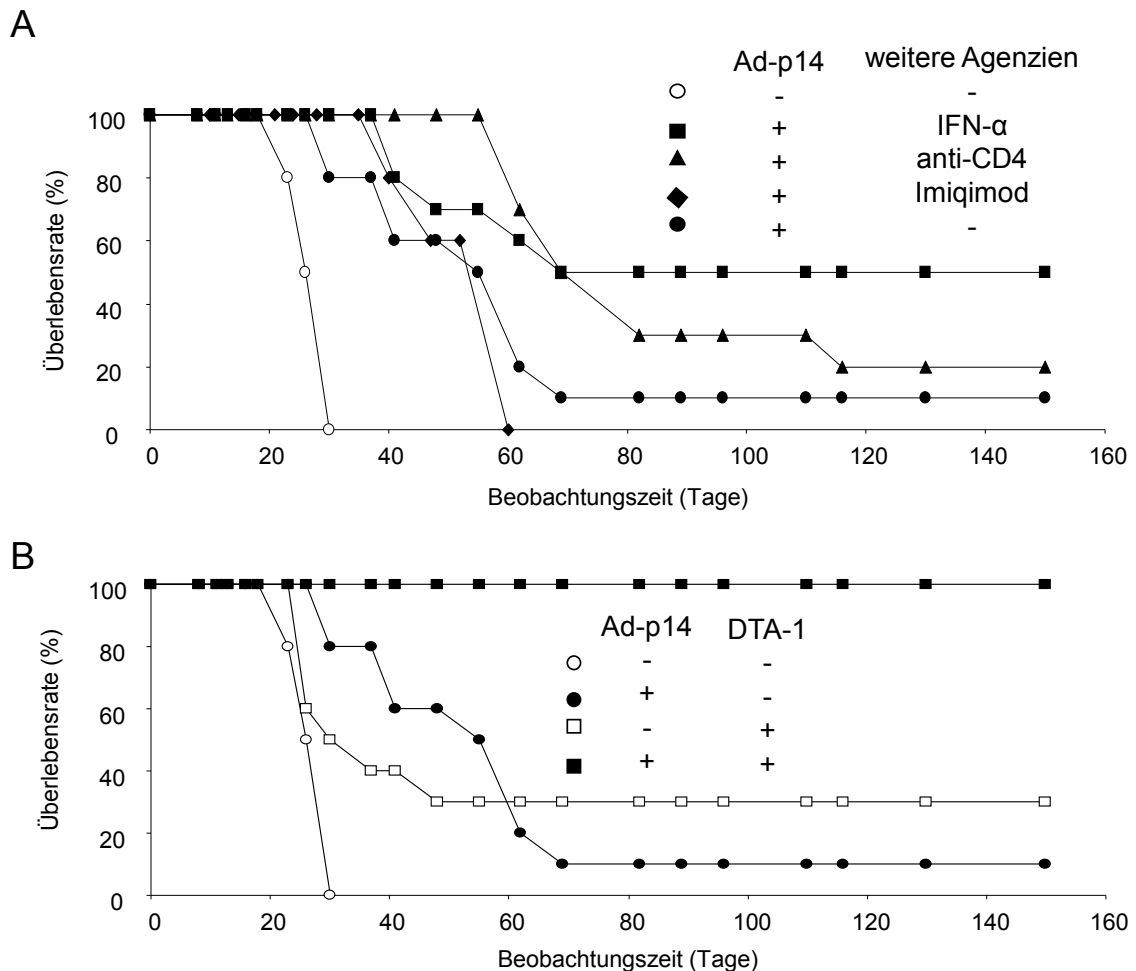
**Abbildung 17: Tumor-infiltrierende Lymphozyten in TC1-Tumoren.** Die Detektion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte an Schnitten aus Tumorgewebe, die zu bestimmten Zeitpunkten vor und nach Vakzinierung aus den Versuchstieren isoliert wurden. A) Zeitpunkte der Tumorisation B) Immunhistochemische Antikörperfärbung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in diesen Tumorgewebe. Die Bindung des CD4- bzw. des CD8-Antikörpers wurde über AP/Red (rot) sichtbar gemacht. Die Anzahl CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen sind in den Beispielen angegeben. (Originalvergrößerung x100).

### 3.1.9 Unterstützung der T-Zellantwort durch Immunmodulatoren

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass eine Tumorabstoßung T-zellabhängig ist und, dass während der Regression vermehrt  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen im Tumorgewebe auftreten. Weitere Studien dieser Arbeit sollten klären, ob sich diese durch Ad-p14-Vakzinierung aktivierte T-Zellantwort mit Hilfe von Immunmodulatoren unterstützen bzw. verstärken lässt und somit die Abstoßung der TC1-Tumore verbessert (Abb. 18).

Im ersten Versuch standen  $IFN-\alpha$ , Imiquimod und ein  $CD4^+$  T-zelldepletierender Antikörper als Immunmodulatoren, die bereits aus klinischen Anwendungen bekannt waren, für die Kombination mit Ad-p14 zur Verfügung (Abb. 18A).

Der zweite Versuch kombinierte die Vakzine mit dem bisher in Mäusen getesteten GITR-bindenden Antikörper DTA-1 (Abb. 18B).

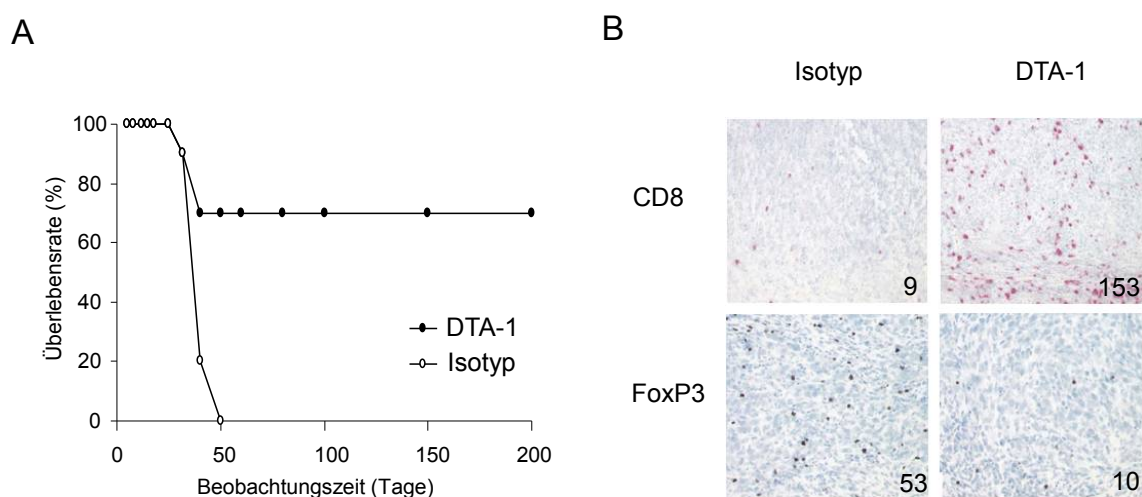


**Abbildung 18: Tumorregression nach Ad-p14-Vakzinierung in Kombination mit verschiedenen Immunmodulatoren.** A) Überlebensrate von Versuchstieren nach zusätzlicher Behandlung mit den Immunmodulatoren  $IFN-\alpha$ , anti-CD4 und Imiquimod. B) Überlebensrate nach Immunisierung, kombiniert mit der Applikation des gegen den mGITR gerichteten Antikörpers DTA-1. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=10$

Bei unbehandelten Versuchstieren wurde der Versuch 30 Tage nach Tumorsetzung beendet, da die Tumore zu diesem Zeitpunkt das maximale Volumen von 1 cm<sup>3</sup> bereits überschritten. Aus diesem Grund mussten bis 60 Tage nach Tumorsetzung auch 80% der alleinig Ad-p14-geimpften Versuchstiere getötet werden und nur 10% dieser Tiere überlebten bis zum Versuchsende nach 150 Tagen. Mäuse, die im ersten Versuch zusätzlich zur Vakzinierung mit Imiquimod behandelt waren, wurden nur bis Tag 60 in den Versuch eingeschlossen. Die Überlebensrate steigerte sich bei einer zusätzlichen Behandlung mit dem CD4-Antikörper, so dass 20% der Tiere überlebten. Die Kombination mit IFN- $\alpha$  führte im ersten Versuch zur höchsten Überlebensrate, bei der die Tumore in 40% der Tiere regridierten.

Erfolgte im zweiten Versuch ausschließlich die Applikation von DTA-1, ohne Vakzinierung, überlebten bereits 30% der Tiere (Abb. 18B). In Kombination mit der Ad-p14-Vakzinierung überlebten alle Versuchstiere. Die TC1-Tumore bildeten sich nach dieser Behandlung komplett zurück und wuchsen nicht wieder aus.

Versuchstiere eines weiterführenden Experiments mit Tumoren, die sich aus C3-Zellen entwickelten, erhielten ebenfalls DTA-1, um den Einfluss auf die Entwicklung und die damit verbundenen immunologischen Eigenschaften der C3-Tumore zu beobachten (Abb. 19).

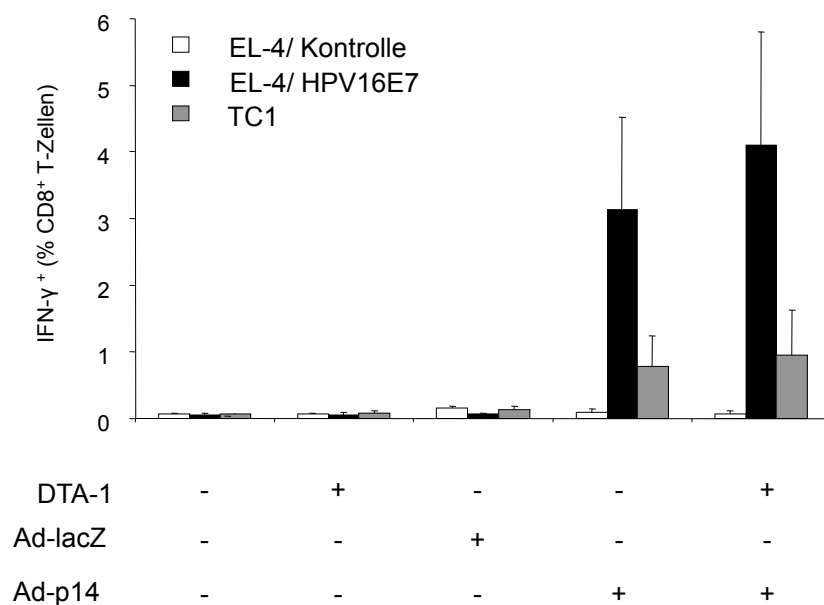


**Abbildung 19: Wachstum von C3-Tumoren nach DTA-1-Gabe.** C3<sup>+</sup> Versuchstieren wurde entweder ein Kontrollantikörper oder DTA-1 appliziert. A) Überlebensrate der Versuchstiere über einen Zeitraum von 200 Tagen. Mittelwerte  $\pm$  SD von n=10 B) Tumorgewebe, fünf Tage nach Applikation der Antikörper. Immunohistochemische Färbung über LSAB für CD8 (rot) und FoxP3 (braun). Exemplarisch für drei unabhängige Versuche. Die Anzahl CD8<sup>+</sup> bzw. FoxP3<sup>+</sup> Zellen sind in den Beispielen angegeben. (Originalvergrößerung x100)

Während die C3-Tumore der Kontrolltiere innerhalb von drei Wochen kontinuierlich expandierten, verkleinerten sich die Tumore bei 70% der Versuchstiere. Gewebeproben für die Beschreibung  $CD8^+$  und  $FoxP3^+$  T-Zellen wurden fünf Tage nach Applikation des DTA-1 entnommen. Art und Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten unterschieden sich wesentlich in den Geweben der beiden Versuchsgruppen. Durch DTA-1 infiltrierten mehr als zehn Mal so viele  $CD8^+$  T-Zellen den Tumor, die Anzahl  $FoxP3^+$  Zellen verringerte sich um das Fünffache.

### 3.1.10 Einfluss des DTA-1 auf die Anzahl HPV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen

Der Nachweis der  $IFN-\gamma$ -Sekretion HPV-spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen erfolgte in Splenozytenpopulationen aus  $TC1^+$  Mäusen, die entweder unbehandelt oder vakziniert waren, eine Kombination aus Ad-p14-Vakzine und DTA-1 Behandlung oder nur eine DTA-1 Behandlung erhielten (Abb. 20).



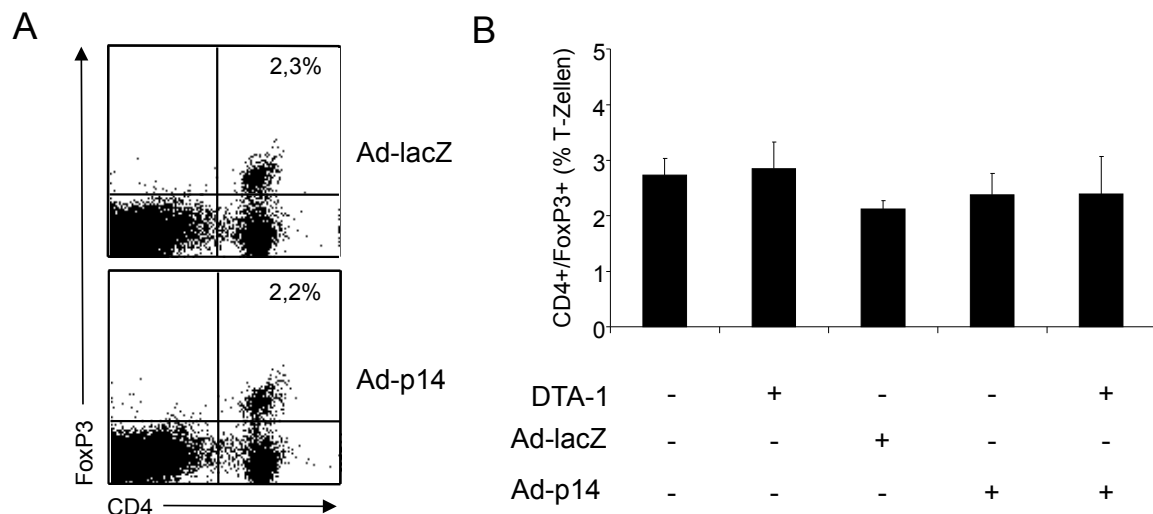
**Abbildung 20:  $IFN-\gamma^+$  HPV-spezifische CTL in DTA-1-behandelten und Ad-p14-immunisierten Mäusen mit TC1-Tumoren.** Splenozyten von unterschiedlich behandelten Mäusen (unbehandelt, DTA-1, Ad-lacZ, Ad-p14, Ad-p14/DTA-1) wurden mit Zielzellen (EL-4-Zellen, EL-4/ HPV16E7-Zellen und TC1-Zellen) kokultiviert und der Anteil der  $IFN-\gamma$ -sezernierenden  $CD8^+$  T-Zellen zytometrisch bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=3$

In Milzzellen aus Kontrolltieren (PBS, Ad-lacZ) und DTA-1 behandelten Tieren konnten im Vergleich zu Ad-p14-geimpften Tieren keine  $IFN-\gamma^+/CD8^+$  T-Zellen nachgewiesen

werden. Mit EL-4/HPV16E7-Zellen als Stimulatoren erreichten die mit Ad-p14 aktivierten CTL Frequenzen von 2,5-4,5%  $\text{IFN-}\gamma^+/\text{CD8}^+$  T-Zellen. Die Frequenzen der mit Ad-p14/DTA-1 aktivierten CTL lagen zwischen 3 und 6%, und somit durchschnittlich 1% höher als die der Ad-p14 aktivierten CTL. Mit TC1-Zellen als Stimulatoren verringerten sich die Frequenzen der  $\text{IFN-}\gamma^+/\text{CD8}^+$  T-Zellen deutlich. Dabei war die Frequenz der Ad-p14/DTA-1 aktivierten CTL mit 1% wiederum höher, als die nur mit Ad-p14 aktivierten CTL, mit 0,8 %  $\text{IFN-}\gamma^+/\text{CD8}^+$  T-Zellen. In  $\text{TC1}^+$  Mäusen, die ausschließlich DTA-1 erhielten und bei denen 30% der Tiere die Tumore abstießen, wurden keine HPV16E7-spezifischen CTL nachgewiesen.

### 3.1.11 Einfluss des DTA-1 auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen

Die Untersuchung der Anzahl regulatorischer T-Zellen erfolgte an Blutproben von  $\text{TC1}^+$  Tieren aus dem vorangegangenen Versuch nach Vakzinierung und Behandlung mit DTA-1. In den angereicherten PBMC wurde die Anzahl  $\text{CD4}^+/\text{FoxP3}^+$  T-Zellen ermittelt (Abb. 21).



**Abbildung 21: Frequenz regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut nach DTA-1-Behandlung.** Unterschiedlich behandelten  $\text{TC1}^+$  Mäusen (Ad-lacZ, Ad-p14, DTA-1, Ad-p14/DTA-1) wurde peripheres Blut entnommen und daraus die PBMC isoliert. Diese wurden anschließend mit CD4- und FoxP3-Antikörpern gefärbt und zytometrisch analysiert. A) Exemplarische FACS-Analyse einer CD4/FoxP3-Antikörperfärbung von PBMC der Ad-lacZ-behandelten Tiere (linker Plot) und PBMC der Ad-p14-immunisierten Tiere (rechter Plot). Anteile von  $\text{CD4}^+/\text{FoxP3}^+$  Zellen sind für die Beispiele angegeben. B) Anteil der  $\text{CD4}^+/\text{FoxP3}^+$  T-Zellen im peripheren Blut der Tiere aus fünf Versuchsgruppen. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=3$

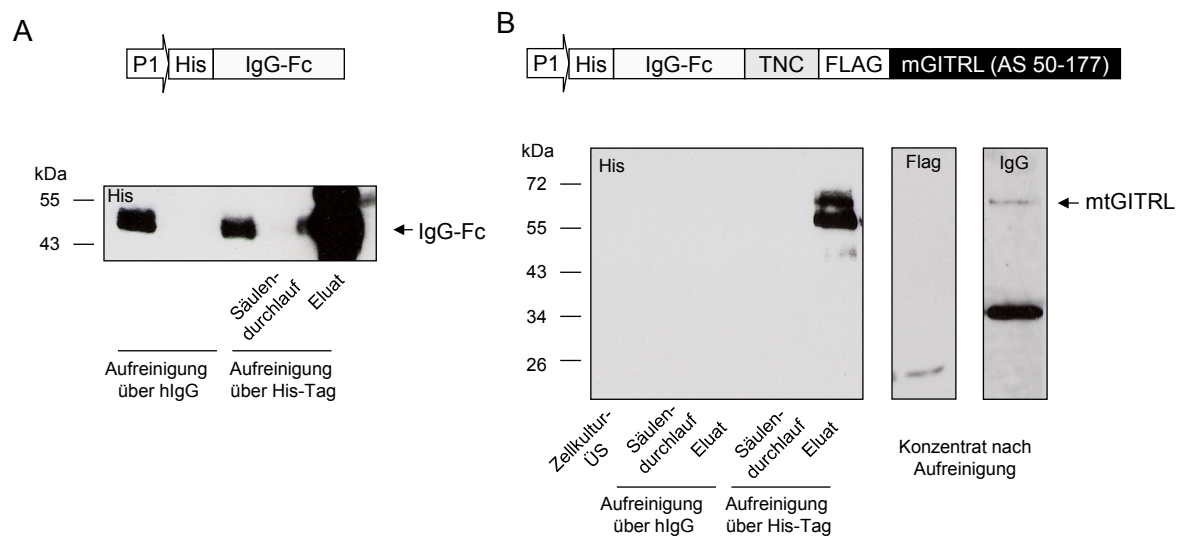
Die Behandlung mit DTA-1 veränderte die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Blut der  $\text{TC1}^+$  Mäuse nicht. Auch in Kombination mit der Ad-p14-Impfung ließ sich keine



Veränderung in der Anzahl der Treg beobachten. Die Lyphozytenproben aus dem Blut aller Versuchstiere enthielten durchschnittlich 2 bis 3% regulatorische T-Zellen.

### 3.1.12 Herstellung eines rekombinanten Proteins zur Aktivierung des *Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Receptor (GITR)*-Signalweges

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte ein Protein hergestellt werden, welches vergleichbare funktionelle Eigenschaften wie der DTA-1 besitzt, also den GITR-Signalweg durch die Bindung an den murinen GITR aktiviert (Abb. 22).

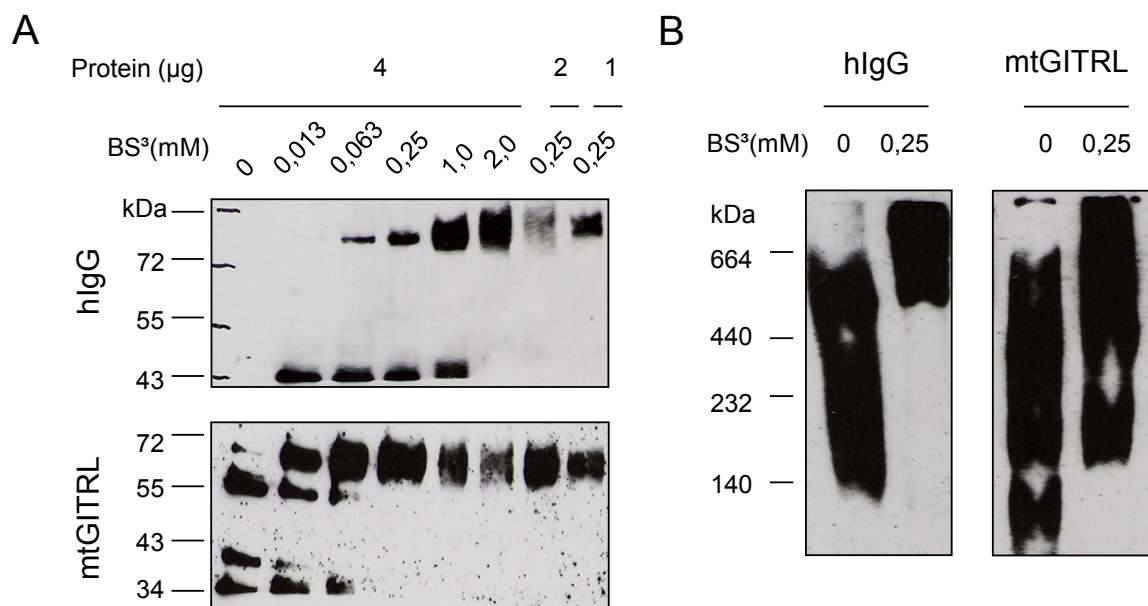


**Abbildung 22: Murines trimerisierender mtGITRL.** Die Proteine wurden in HEK-S-Zellen exprimiert und über eine Protein-A-Sepharose- und Ni-NTA-Säule gereinigt und im Western Blot analysiert. In den Abbildungen A und B (oben) sind schematisch die Expressionskassetten dargestellt. A) Kontrollprotein mit His-Antikörper. B) mtGITRL-Protein unmittelbar nach Expression in HEK-Zellen (His-Antikörper, linke Abbildung) und 24 h nach Aufreinigung (His-Antikörper, Flag-Antikörper, hIgG-Antikörper, rechte Abbildung).

Der wichtigste Bestandteil des Proteinexpressionsvektors war die Sequenz des extrazellulären Bereiches des murinen GITRL. Hinzu kam die Sequenz der Trimerisierungsdomäne von TNC, da normalerweise für die Aktivierung einer Signalkaskade eine Interaktion von mindestens drei Liganden erforderlich ist. Um die spezifische Anreicherung des Proteins durch eine Immunpräzipitation zu ermöglichen, seine Stabilität zu verbessern und die Halbwertszeit zu verlängern, folgten die Sequenzen des His- und Flag-Tags sowie von hIgG-Fc. HEK-S-Zellen exprimierten den murinen trimerisierenden mtGITRL nach Transfektion des Vektors. Der mtGITRL reichte sich aufgrund einer sekretorischen Sequenz des Vektors im Zellüberstand an und ließ sich daraus durch Immunpräzipitation isolieren. Auf die gleiche Weise wurde ein

Kontrollprotein generiert, welches sich aus dem hIgG-Fc und einem His-Tag zusammensetzte. Dieses Kontrollprotein, mit einer Länge von 347 Aminosäureresten mit einem theoretischen Molekulargewicht von 38 kDa erreichte durch Glycosylierung im hIgG-Fc eine Größe von 48 kDa, wie in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen wurde (Abb. 22A).

Das mtGITRL-Protein mit einer Länge von 453 Aminosäureresten, stellte sich durch die hIgG-Fc-Glykosylierung mit einem Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa dar. Es ließ sich jedoch einen Tag nach der Aufreinigung nicht mehr in der Western-Blot-Analyse nachweisen. Lediglich Bruchstücke des vorderen hIgG-Fc-Bereiches mit einer Größe von ungefähr 40 kDa sowie des hinteren GITRL-Bereiches mit einer Größe von ungefähr 20 kDa konnten dargestellt werden (Abb. 22B). Aufgrund dessen folgte direkt nach der Aufreinigung eine Stabilisierung der Proteine mit Hilfe des Protein-vernetzenden Linkers BS<sup>3</sup> (Abb. 23).

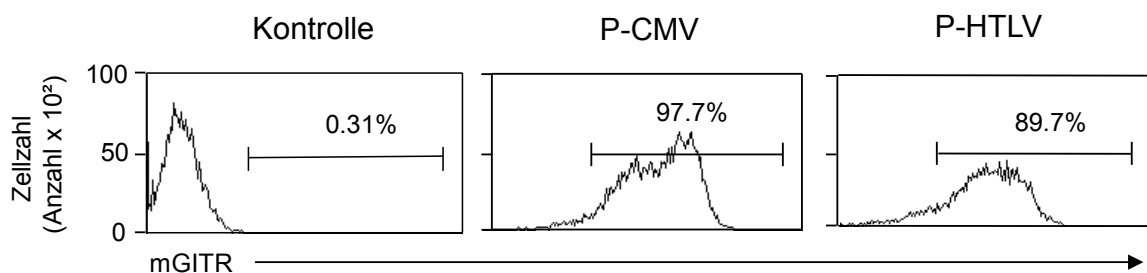


**Abbildung 23: Stabilisierung der mtGITRL-Proteine durch Vernetzung.** Proben gereinigter Proteine wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Linkermoleküls BS<sup>3</sup> vernetzt und in der Western-Blot-Analyse durch die Antikörperfärbung mit einem für den His-Tag-spezifischen Antikörper dargestellt. A) Untersuchung verschiedener Vernetzungsgrade der Proteine nach Auftrennung im denaturierenden homogenen Gel. B) Darstellung der Proteine in der Western-Blot-Analyse nach der Auftrennung im nativen Gradientengel.

Mit steigender Konzentration des BS<sup>3</sup> ließ sich eine Dimerisierung der hIgG-Fc-Kontrollproteine beobachten (Abb. 23A, B). Eine effektive Stabilisierung der mtGITRL-Proteine zeigte sich in Proben mit einer Linkerkonzentration von 250 nM BS<sup>3</sup> und einer Proteinmenge von 4 µg. Unter nativen Bedingungen erschienen nach

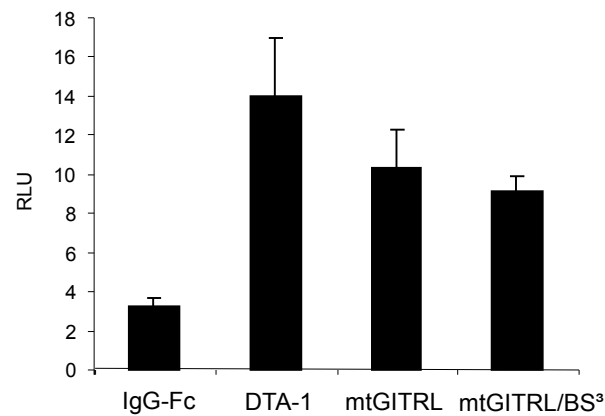
Verwendung des Linkers mtGITRL-Proteinkomplexe mit einer Größe von mehr als 180 kDa, also Aggregate aus drei und mehr Proteinen (Abb. 23B). Die nicht vernetzten Proteine bildeten ebenfalls Komplexe, unter denen sich Dimere mit 120 kDa Trimere mit 180 kDa und größere Proteinverbindungen mit Molekulargewichten bis zu 540 kDa darstellten.

Die Funktionalität dieser Proteinkomplexe wurde mit Hilfe einer GITR<sup>+</sup> Zelllinie untersucht. Für die Herstellung dieser Zelllinie wurden zwei Plasmide mit verschiedenen Promotoren verwendet und miteinander verglichen (Abb. 24).



**Abbildung 24: mGITR<sup>+</sup> Zelllinie.** Vergleich der Expressionsstärke des transgenen mGITR unter der Kontrolle zweier verschiedener Promotoren nach Transfektion und G418-Selektion in HEK-293T-Zellen. Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse nach Antikörperfärbung. Die prozentualen Anteile von mGITR<sup>+</sup> Zellen sind für die Beispiele angegeben.

Ein Vergleich der Expressionsstärke beider Plasmide zeigte, dass HEK-293T-Zellen, transfiziert mit dem CMV-Promotor-Plasmid, den mGITR auf der Oberfläche am stärksten exprimierten. Dieses Plasmid ließ sich zudem besser transfizieren als das Plasmid mit HTLV-Promotor. Die Untersuchung der Aktivität des mtGITRL-Proteins erfolgte daher mit Hilfe einer mit der CMV-Promotor-Plasmid generierten Zelllinie. Die Funktionalität der nativen und der vernetzten mtGITRL-Proteine sowie der DTA-1-Proteine wurde durch die aus der Interaktion von GITR und seinem Liganden resultierenden Aktivierung des NFκB-Signalweges in einem Luziferasetest bestimmt (Abb. 25).



**Abbildung 25: Aktivität des mtGITRL-Proteins.** Nachweis der durch die rekombinanten Proteine induzierten Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges. Bestimmung der Aktivität im Luziferasetest durch Detektion der *Relative Light Units* (RLU). Mittelwerte  $\pm$  SD von n=3

Die IgG-Fc-Kontrolle definierte eine Hintergrundaktivität der Luziferase von 2-4 RLU. Die Bindung der DTA-1-Proteine bewirkte im Vergleich zu den Kontrollen eine vier- bis fünffache Steigerung der Luziferaseaktivität. Die nativen mtGITRL-Proteine führten zu einer vierfachen Steigerung der Aktivität. Die vernetzten Proteine waren im Vergleich dazu weniger aktiv. Sie erzielten nur eine dreifach höhere Aktivität als die Kontrollen.

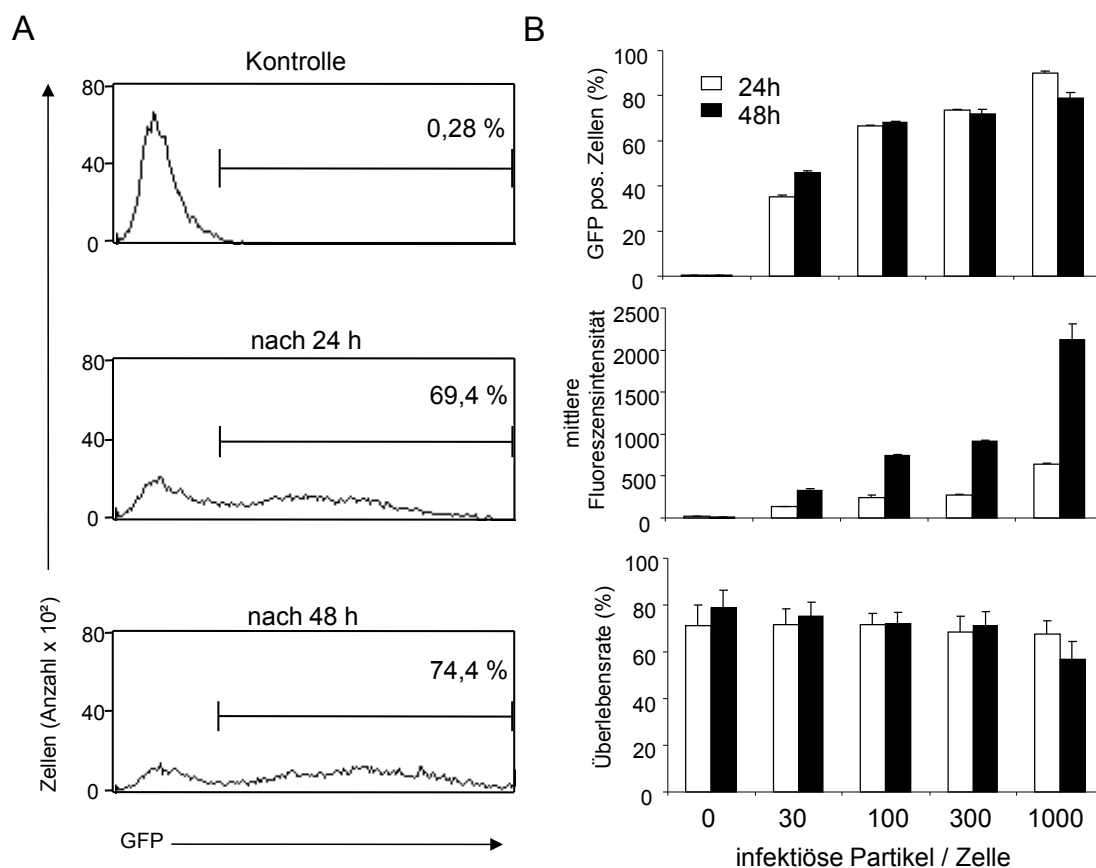
Somit aktivierten die mtGITRL-Proteine durch ihre Bindung an den GITR den NF $\kappa$ B-Signalweg mit einer vergleichbaren Stärke, wie der DTA-1 und konnten insofern als DTA-1-Analoga verwendet werden. Die Untersuchung der mtGITRL-Proteine in Verbindung mit der Ad-p14-Vakzinierung in Mäusen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 3.2 HPV-spezifische zelluläre Immunantwort beim Menschen

#### 3.2.1 Präsentation des p14-Antigens zur Aktivierung HPV-spezifischer CTL

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf den Untersuchungen zur Wirkung der Ad-p14-Vakzine im Menschen. Es wurde geprüft, ob sich durch eine Impfung im Menschen wie in Mäusen HPV-spezifische CTL aktivieren lassen. Diese HPV-spezifische Aktivierung erfolgte *in vitro* an humanen PBMC, welche zuvor hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten zusammengesetzten *Buffy Coats* isoliert wurden.

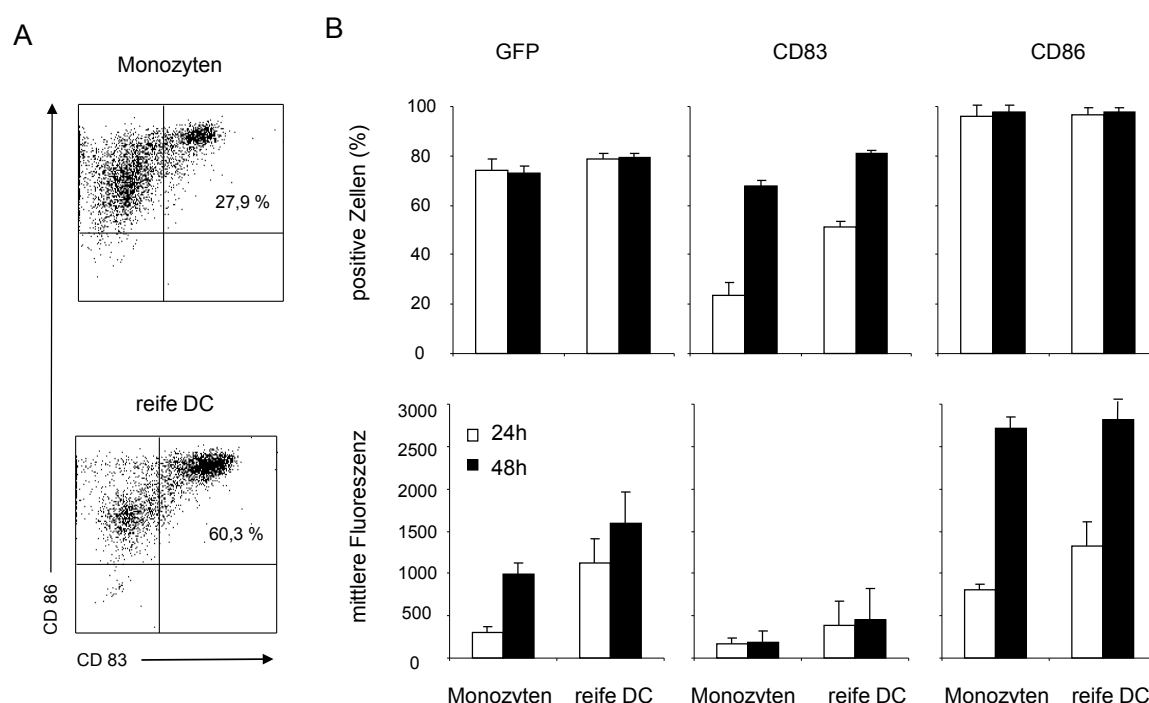
Zunächst richteten sich die Untersuchungen auf DC als APC, die für die Aktivierung der CTL erforderlich sind. Hierbei war es relevant zu ermitteln, inwieweit DC den Impfstoff aufnehmen, das Antigen exprimieren und in Verbindung mit den für eine T-Zellaktivierung benötigten Oberflächenmarkern präsentieren. Diese wurden sowohl in Monozyten, die aus PBMC separiert waren, als auch in daraus hergestellten reifen DC analysiert.



**Abbildung 26: Transduktionseffizienz verschiedener MOI von Adenoviren.** Monozyten wurden mit dem Kontroll-Ad-GFP transduziert und 24 h und 48 h später durchflusszytometrisch bewertet. A) Exemplarische Darstellung einer FACS-Analyse nach Transduktion mit einer MOI von 300. Die prozentualen Anteile von GFP<sup>+</sup> Zellen sind für die Beispiele angegeben. B) Anteil (obere Grafik) und Fluoreszenzintensität von GFP<sup>+</sup> Zellen (mittlere Grafik) sowie Überlebensrate aller Zellen nach der Transduktion (untere Grafik) aus der durchflusszytometrischen Analyse 24 h bzw. 48 h nach Transduktion mit verschiedenen MOI des Ad-GFP. Mittelwerte  $\pm$  SD von n=2

Mittels des Kontrollvirus Ad-GFP konnte zunächst die effizienteste Anzahl von IP pro Zelle durchflusszytometrisch ermittelt werden (Abb. 26). Die untersuchten Monozytenpopulationen zeigten nach adenoviraler Transduktion Gentransferraten von 40-90%. Unter Betrachtung der Expressionsstärke des Transgens und der Überlebensrate der Monozyten zeichneten sich die effektivsten Transferraten mit einer Konzentration von 300 Adenoviren pro Zelle ab.

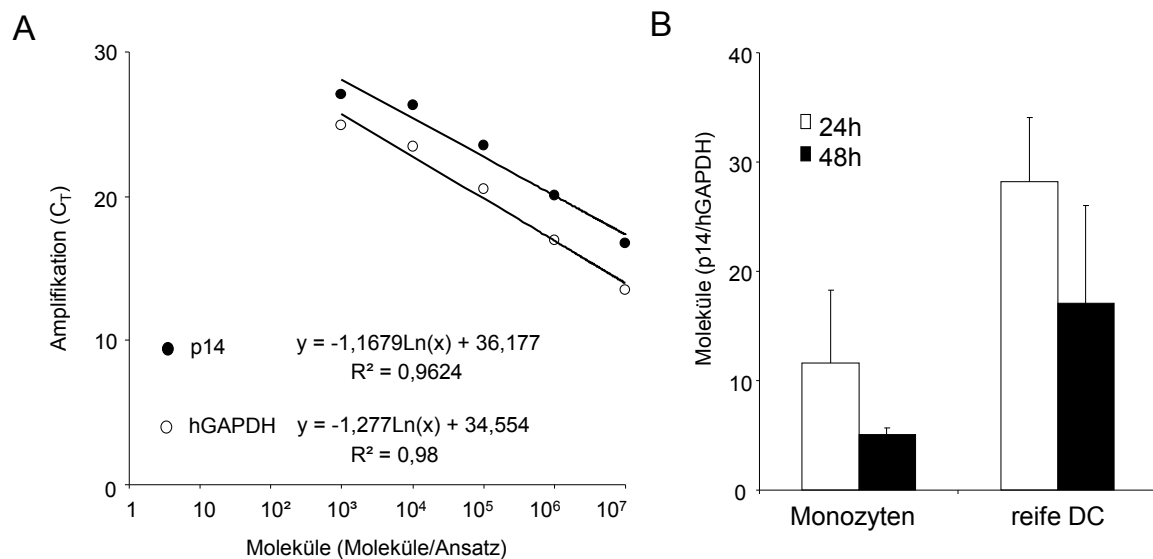
Mit dieser Konzentration wurden im nächsten Schritt Monozyten und reife DC transduziert und hingehend ihrer für eine T-Zellaktivierung erforderlichen Expression der Oberflächenmarker CD83 und CD86 analysiert (Abb. 27).



**Abbildung 27: Effizienz der Transduktion von Monozyten und reifen DC.** Monozyten und reife DC wurden mit Ad-GFP (MOI 300) transduziert und 24 h bzw. 48 h später nach Färbung für die Aktivierungsmarker CD83 und CD86 durchflusszytometrisch analysiert. A) Exemplarische Darstellung einer FACS-Analyse mit Angabe der prozentualen Anteile von CD83<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> Zellen für die Beispiele. B) Anteil positiver Zellen (obere Reihe) und Fluoreszenzintensität (untere Reihe) aus der durchflusszytometrischen Analyse nach Transduktion. Mittelwerte  $\pm$  SD von n=2

Reife DC ließen sich besser als Monozyten transduzieren und zeigten eine fast doppelt so starke Expression des GFP-Transgens. Die Frequenzen der für eine T-Zellaktivierung erforderlichen kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 unterschieden sich in geringem Maße und waren aber erwartungsgemäß in den Populationen reifer DC höher als in Monozyten.

Die Expression des Vakzinegens p14 wurde im letzten Schritt in einer Genexpressionsanalyse von Monozyten und reifen DC nach Transduktion mit Ad-p14 überprüft (Abb. 28).



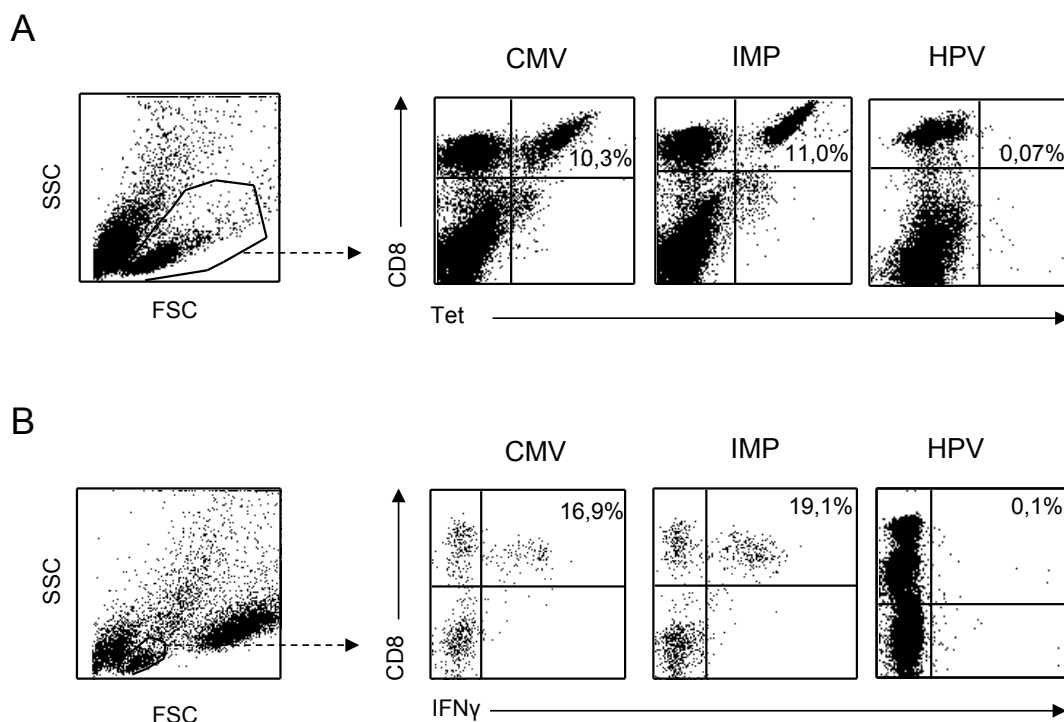
**Abbildung 28: Expression des Transgens p14 in Monozyten und reifen DC nach adenoviralem Transfer.** A) Standardreihen aus den spezifischen TaqMan-PCR mit definierten Molekülzahlen klonierter Sequenzen von p14 und hGAPDH. Die entsprechenden Formeln der Regressionsgeraden sowie die Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) sind angegeben. B) Aus Monozyten und reifen DC wurde 24 h bzw. 48 h nach Transduktion mit Ad-p14 (MOI 300) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einem gemeinsamen Ansatz einer spezifischen TaqMan-PCR für p14 und GAPDH unterzogen. Die Anzahl von p14-mRNA-Molekülen wurde anhand der entsprechenden Standardreihen im Vergleich zur hGAPDH als Haushaltsgen ermittelt. Bestimmung in der PCR der Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=2$

In Monozyten und reifen DC, die zu Kontrollzwecken mit Ad-GFP transduziert waren, ließ sich keine p14-Expression nachweisen. Ad-p14-transduzierte Zellen exprimierten zu beiden Zeitpunkten nach Transduktion p14. Reife DC zeigten im Vergleich zu Monozyten eine fast dreifach stärkere p14-Expression. In der Gesamtpopulation transduzierter Zellen betrug die Anzahl der p14-Moleküle/hGAPDH 24 h nach Transduktion in Monozyten durchschnittlich 12 und in reifen DC durchschnittlich 28; diese verringerte sich nach 48 h jeweils um die Hälfte.

Resultierend aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurden in den folgenden Versuchen reife DC 24 h nach Ad-p14-Transduktion mit einer MOI von 300 zur Aktivierung HPV-spezifischer T-Zellen verwendet.

### 3.2.2 Erkennung des Antigens und Produktion von Interferon- $\gamma$ durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die mit Ad-p14 transduzierten DC stimulierten in den folgenden Experimenten die autologen PBMC aus den *Buffy Coats*. Die Stimulationen der PBMC in den Kontrollen erfolgte mit DC, die ein Kontrollantigen präsentierten und vorher entweder mit den entsprechenden Peptiden beladen oder mit Plasmiden transfiziert waren. Spezifische CTL aus den Stimulationen wurden anhand der Bindung spezifischer HLA-A2-Tetramere und der Expression von IFN- $\gamma$  als Surrogatparameter durchflusszytometrisch dargestellt (Abb. 29).



**Abbildung 29: Nachweis spezifischer CTL durch Surrogatparameter.** PBMC wurden mit autologen DC inkubiert, die entweder mit dem CMV<sup>pp65</sup><sub>495-503</sub>- (CMV) oder IMP<sub>158-66</sub>-Peptid beladen (IMP) oder mit Ad-p14 transduziert waren (HPV). Der Erfolg der Stimulation wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit einem CD8-Antikörper in Kombination mit entsprechenden spezifischen HLA-A2-Tetrameren (Tet; A) oder einem IFN- $\gamma$ -Antikörper bewertet (B) und ist exemplarisch für 4 Versuche dargestellt. Die Zellen wurden anhand ihrer FSC/SSC-Eigenschaften in die Analyse einbezogen (linke Plots). Die prozentualen Anteile von CD8<sup>+</sup>/HLA-A2-Tetramer<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen sind für die Beispiele angegeben.

Die Präsenz der für eine Antigenerkennung erforderlichen Antigen-spezifischen T-Zellrezeptoren wurde anhand einer Färbung mit HLA-A2-Tetrameren überprüft (Abb. 29A, Tab. 15). Die für aktivierte CTL spezifische INF- $\gamma$ -Sekretion wurde in einem Zytokinsekretionstest analysiert (Abb. 29B, Tab. 16).



Die für die Färbungen mit HLA-A2-Tetrameren verwendeten PBMC waren zuvor mit Ad-p14-transduzierten DC bzw. mit CMVpp65<sub>495-503</sub>- oder IMP<sub>58-66</sub>-Peptid-beladenen DC stimuliert worden. Nach CD8/HLA-A2-Tetramer-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse konnten in den PBMC, die mit CMVpp65<sub>495-503</sub>- oder IMP<sub>58-66</sub>-beladenen DC stimuliert waren, CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, die gleichzeitig HLA-A2/CMVpp65<sub>495-503</sub>-Tet<sup>+</sup> bzw. HLA-A2/IMP<sub>58-66</sub>-Tet<sup>+</sup> waren. Dabei ließen sich in den CMVpp65<sub>495-503</sub>-Linien zwischen 3,8 und 18,8% und in den IMP<sub>58-66</sub>-Linien zwischen 4,3 und 33% CD8<sup>+</sup>/Tet<sup>+</sup> T-Zellen detektieren. In den Zelllinien, die mit Ad-p14-Vakzine-transduzierten DC stimuliert waren, lagen keine HPV16E7<sub>11-20</sub>-Tet<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor (Tab. 3.2).

**Tabelle 15: Frequenzen Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach in-vitro-Inkubation mit spezifisch aktivierenden autologen DC.** PBMC wurden wie für Abbildung 3.22 beschrieben mit autologen DC inkubiert und durchflusszytometrisch bewertet. n.d. – nicht nachweisbar

DC in der Stimulation	Peptid im HLA-A2-Tetramer	Spender (#)	CD8 <sup>+</sup> (% aller T-Zellen)	Tet <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)
beladen mit CMVpp65 <sub>495-503</sub>	CMVpp65 <sub>495-503</sub>	36	30,0	8,5
		37	44,1	3,1
		55	16,0	3,0
		98	36,5	1,4
		127	32,1	15,3
		B1	30,0	10,2
		Mittelwert ± SD	31,5 ± 8,5	6,9 ± 4,9
beladen mit IMP <sub>58-66</sub>	IMP <sub>58-66</sub>	34	40,2	10,0
		37	40,4	2,4
		56	22,9	1,0
		B2	33,0	11,0
		Mittelwert ± SD	34,1 ± 7,1	6,1 ± 4,4
transduziert mit Ad-p14	HPV16E7 <sub>11-20</sub>	33	37,0	0,1
		34	27,0	0,1
		36	19,1	n.d.
		37	37,0	0,1
		Mittelwert ± SD	30,0 ± 7,5	0,1 ± 0

Für die Bestimmung der CTL-spezifischen INF- $\gamma$ -Sekretion wurden Zelllinien durch Stimulation mit DC hergestellt, die entweder mit den Plasmiden, pCMV, pIMP, p16E7 oder pp14 transfiziert oder mit Ad-p14 transduziert waren. Die Induktion der Zytokinsekretion erfolgte durch Inkubation der PBMC mit Stimulatoren wie KA2-Zellen

oder BLCL. Diese waren entweder mit den Expressionsplasmiden pCMV für CMVpp65, pIMP für IMP, p16E7 für HPV16E7 oder pp14 für das komplexe Impfantigen transfiziert oder mit der HPV-Vakzine Ad-p14 transduziert. Einer CD4-, CD8- und IFN- $\gamma$ -Antikörperfärbung der Zellen aus den Kulturen schloss sich die durchflusszytometrische Analyse an (Tab. 16).

**Tabelle 16: Frequenzen Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nach *in-vitro*-Inkubation mit spezifisch aktivierenden KA2-Zellen oder autologen BLCL. n.d. – nicht nachweisbar**

Linien stimuliert	Spender	Stimulatoren in	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>
über		Restimulation	(% T-Zellen)	(% T-Zellen)	(% CD8 <sup>+</sup> T-Zellen)
pCMV	B1	KA2/CMVpp65	46,5	44,4	16,5
pIMP	B2	KA2/IMP	26,4	53,3	18,2
p16E7	135	KA2/HPV16E7	60	9,8	0,2
	136		29,2	36,1	0,4
pp14	135		55,2	13,4	n.d.
	136		28	38,1	n.d.
Ad-p14	124		9,5	33,5	n.d.
	125		8,2	36,7	n.d.
	127		20,7	45,9	0,6
	135		85,1	2,3	0,1
	136		32,2	49,4	n.d.
	124	BLCL/HPV16E7	9,5	33,5	n.d.
	125		8,2	36,7	n.d.
	127		20,7	45,9	n.d.

In CMVpp65- und IMP-spezifischen Linien konnte eine CTL-spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen werden. Der Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen betrug in der CMVpp65-Linie 16,5% und in der IMP-Linie 18,2%. Im Gegensatz dazu wurde unabhängig von der Darreichung des HPV16E7 keine Antigen-spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC-Kulturen nach Inkubation mit Plasmid-transfizierten oder Ad-p14-transduzierten Stimulatoren nachgewiesen.

Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sezernierten IFN- $\gamma$  weder nach Stimulation mit KA2, die das Antigen über nur einen HLA-Subtyp präsentierten, noch nach Stimulation mit BLCL, die das Antigen über das gesamte HLA-Spektrum präsentieren konnten.

Durch Stimulation von PBMC mit für die Beladung des Antigens transfizierten APC *in vitro* ließen sich CMVpp65- und IMP-spezifische CTL generieren, HPV-spezifische CTL wurden mit diesen Transfektions- und Transduktionsansätzen nicht gefunden.

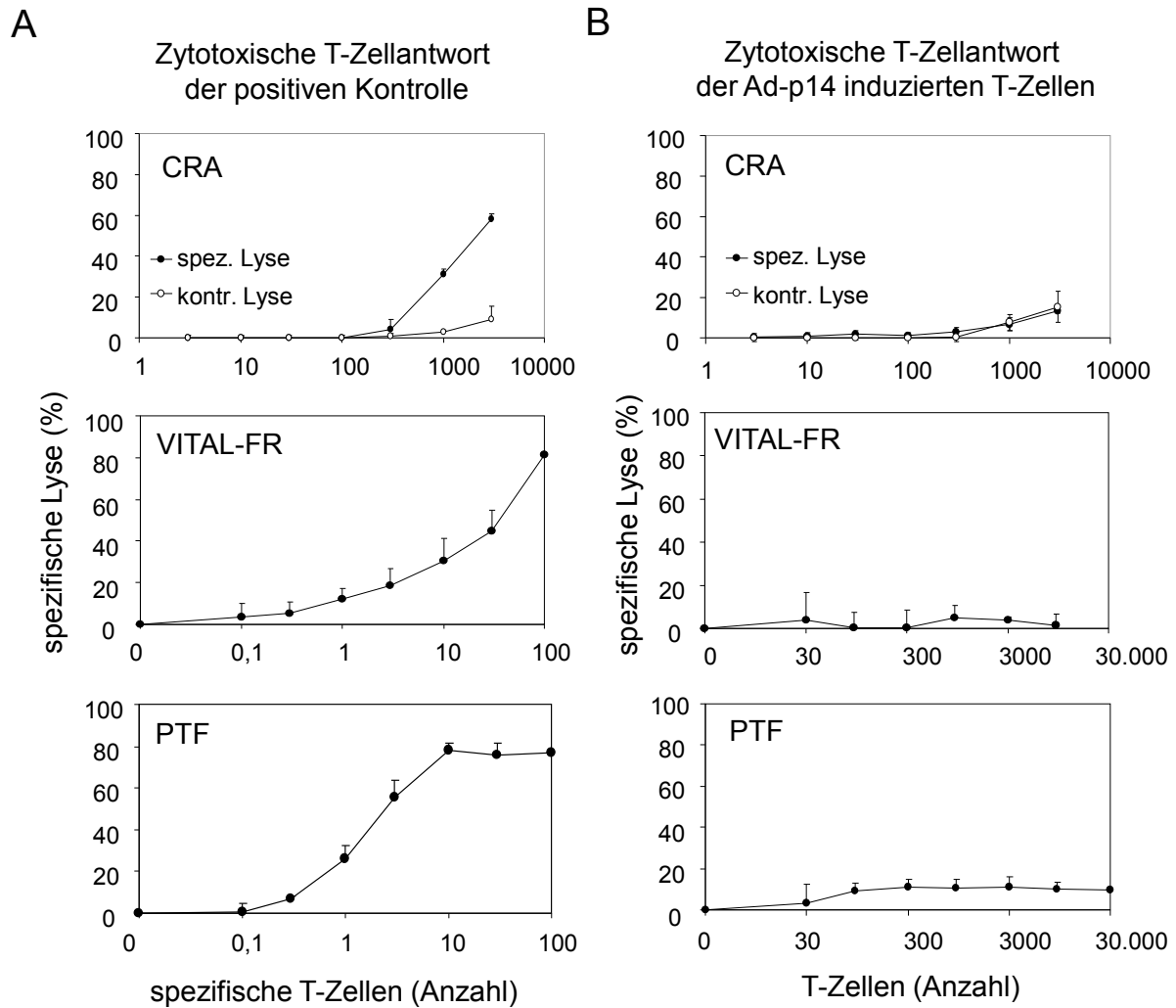
### 3.2.3 Zytotoxische Aktivität Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Im Folgenden wurde die zytolytische Aktivität der CTL aus den *in-vitro*-Stimulationen in verschiedenen experimentellen Systemen verglichen (Abb. 30, Tab. 17, Tab. 18).

Die untersuchten T-Zelllinien wurden zuvor durch Stimulation von PBMC mit autologen DC hergestellt, die entweder mit den Peptiden CMVpp65<sub>495-503</sub>, IMP<sub>58-66</sub>, HIVpol<sub>510-518</sub> oder dem HPV-Peptidpool beladen, mit den Plasmiden, pCMV, pIMP, p16E7 oder pp14 transfiziert oder mit Ad-p14 transduziert waren.

Im CRA wurde die CTL-spezifische zytotoxische Lyse nach einer Koinkubation der T-Zelllinien und spezifischer Zielzellen anhand der Chromfreisetzung zerstörter Zielzellen ermittelt, im VITAL-FR-Test in einer durchflusszytometrischen Analyse der Zielzellen. Die dabei eingesetzten Zielzellen, wie T2-Zellen oder autologe BLCL waren mit den Peptiden CMVpp65<sub>495-503</sub>, IMP<sub>58-66</sub>, HIVpol<sub>510-518</sub> dem HPV-Peptidpool beladen oder mit Ad-p14 transduziert. Die HPV<sup>+</sup> adhärente Zelllinie SiHa-A2 diente nur im CRA als spezifische Zielzelle. Die Analysen der *in vitro* generierten T-Zelllinien zeigten, dass sich durch die Stimulation mit Antigen-beladenen DC CMVpp65-, IMP- und HIVpol-spezifische CTL aktivieren ließen. Im Vergleich der CTL-Linien im CRA und im VITAL-FR-Test war die Detektion der CTL im VITAL-FR-Test zehnfach sensitiver als im CRA. Eine HPV-spezifische Lyse in diesen Tests ließ sich nach Analyse verschiedener T-Zelllinien, die durch Stimulation mit HPV-Peptidpool beladenen, mit den Plasmiden p16E7 oder pp14 transfizierten oder mit Ad-p14 transduziert DC generiert waren, jedoch nicht nachweisen.

In der PTF, einem weiteren experimentellen System, in dem die Zielzellen nicht nur ausgewählte Peptide aus dem Antigen präsentierten sondern das gesamte Antigen prozessierten, konnte durch die Linien, die in Gegenwart von HPV-Antigen generiert wurden, ebenfalls keine HPV-spezifische Lyse beobachtet werden (Abb. 30, Tab. 17). In den durch Stimulation mit einem anderen Antigen hergestellten Linien konnten dagegen in diesem Test CMVpp65-spezifische CTL dokumentiert werden.



**Abbildung 30: Vergleich der spezifischen zytotoxischen Aktivität von CTL beim Nachweis durch CRA, VITAL-FR-Test und PTF.** Exemplarische Darstellung der Antigen-spezifischen Lyse, die in den drei Zytotoxizitätstests ermittelt wurde. Zelllinien wurden durch Stimulation von PBMC mit autologen DC hergestellt, die entweder mit Peptiden CMVpp65<sub>495-503</sub> beladen, mit den Plasmiden pCMV oder pp14 transfiziert oder mit Ad-p14 transduziert waren. Die Erfassung der Anzahl der CMVpp65-spezifischen CTL erfolgte zuvor durchflusszytometrisch nach Färbung mit einem CD8-Antikörper in Kombination mit entsprechenden spezifischen HLA-A2-Tetrameren. Die CTL-spezifische zytotoxische Lyse wurde nach einer Koinkubation titrierter Zellen der T-Zelllinien im CRA mit  $2 \times 10^3$  Zielzellen/Ansatz (obere Abbildungen) anhand der Chromfreisetzung zerstörter Zielzellen und im VITAL-FR-Test mit  $1 \times 10^3$  Zielzellen/Ansatz (mittlere Abbildungen), sowie in der PTF mit  $5 \times 10^2$  Zielzellen/Ansatz (untere Abbildungen) in einer durchflusszytometrischen Analyse der Zielzellen ermittelt. Die eingesetzten Zielzellen, wie T2-Zellen, KA2-Zellen oder autologe BLCL waren mit den Peptiden CMVpp65<sub>495-503</sub>, IMP<sub>58-66</sub>, HIVpol<sub>510-518</sub>, dem HPV-Peptidpool beladen, mit den Plasmiden pCMV, p16E7, pp14 transfiziert oder mit Ad-p14 transduziert. Zielzellen als Kontrollen waren mit unspezifischen Peptiden beladen oder Plasmiden transfiziert. A) CMVpp65-spezifische Lyse bei CMVpp65-Linien. B) HPV16E7-spezifische Lyse bei p14-Linien. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=3$

**Tabelle 17: Lytische Aktivität Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen im CRA und VITAL-FR-Test.**

Linien stimuliert über autologe DC (#)	Spender	CRA		VITAL-FR-Test	
		spezifische Zielzellen	max.Lyse (%) E/T: 30/1	spezifische Zielzellen	max.Lyse (%) E/T: 100/1
beladen mit CMVpp65 <sub>495-503</sub>	36	T2/CMVpp65 <sub>495-503</sub>	27,0	T2/CMVpp65 <sub>495-503</sub>	-
	37		56,0		98,8
	55		50,0		81,2
beladen mit IMP <sub>58-66</sub>	34	T2/IMP <sub>58-66</sub>	59,0	T2/IMP <sub>58-66</sub>	100,0
	37		62,0		99,3
	56		20,0		98,6
beladen mit HIVpol <sub>510-518</sub>	57	T2/HIVpol <sub>510-518</sub>	23,0	T2/HIVpol <sub>510-518</sub>	75,5
beladen mit HPV-Peptidpool	33	T2/HPV-Peptidpool	n.d.	T2/HPV-Peptidpool	n.d.
	34		n.d.		n.d.
	33	SiHa-A2	n.d.		-
	34		n.d.		-
transduziert mit Ad-p14	33	T2/HPV-Peptidpool	n.d.	T2/ HPV-Peptidpool	n.d.
	36		n.d.		n.d.
	37		n.d.		n.d.
	33	SiHa-A2	n.d.		-
	36		n.d.		-
	37		n.d.		-
	53	BLCL/HPV-Peptidpool	n.d.	BLCL/HPV-Peptidpool	n.d.
	54		n.d.		n.d.
	58		n.d.		n.d.
	53	BLCL/Ad-p14	n.d.	BLCL/Ad-p14	n.d.
	54		n.d.		n.d.
	58		n.d.		n.d.

**Tabelle 18: Lytische Aktivität Antigen-spezifischer CTL in der PTF. n.d. – nicht nachweisbar**

Linien stimuliert über autologe DC	Spender (#)	spezifische Zielzellen	max.Lyse (%) E/T: 100/1
transfiziert mit pCMVpp65	127	KA2/CMVpp65	77,0
	98		95,0
transfiziert mit p16E7	101	KA2/HPV16E7	n.d.
	135		n.d.
	135		n.d.
	136		n.d.
	137		n.d.
transfiziert mit pp14	136		n.d.
	137		n.d.
transduziert mit Ad-p14	101		n.d.

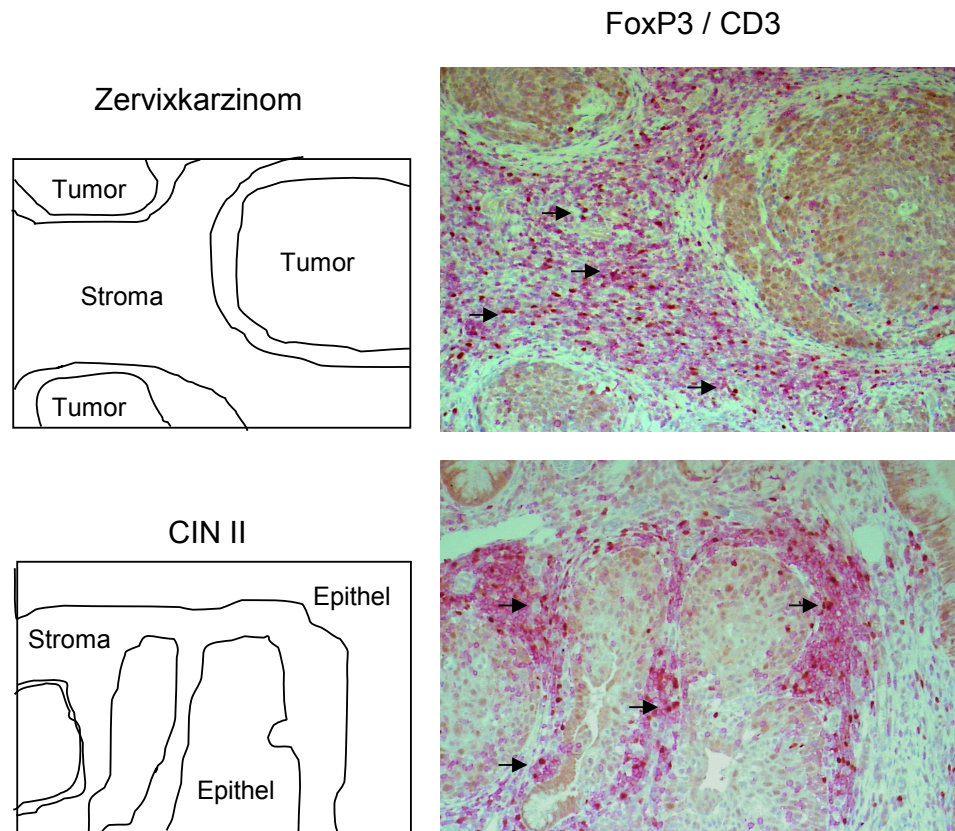
Durch alle drei Testverfahren wurden auf funktioneller Ebene die Antigen-spezifischen zytotoxischen Eigenschaften der CTL für CMVpp65 bestätigt und wie auch über die Surrogatparameter keine HPV-spezifischen CTL gefunden.

### 3.2.4 Frequenz Tumor-infiltrierender Lymphozyten in humanen Tumorgeweben

In den folgenden Experimenten wurden Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) in Zervixkarzinomen charakterisiert und mit TIL in anderen humanen neoplastischen Geweben verglichen (Abb. 31, 32, 33).

In Zervixkarzinomen konnte, im Vergleich zu anderen neoplastischen Erkrankungen wie in Melanomen und Kolonkarzinomen, die nicht durch Viren induziert waren, eine besonders hohe Anzahl an TIL dokumentiert werden. Vergleichbar hohe TIL-Frequenzen wurden interessanterweise auch in den Vorstufen der Zervixkarzinome, den CINII beobachtet.

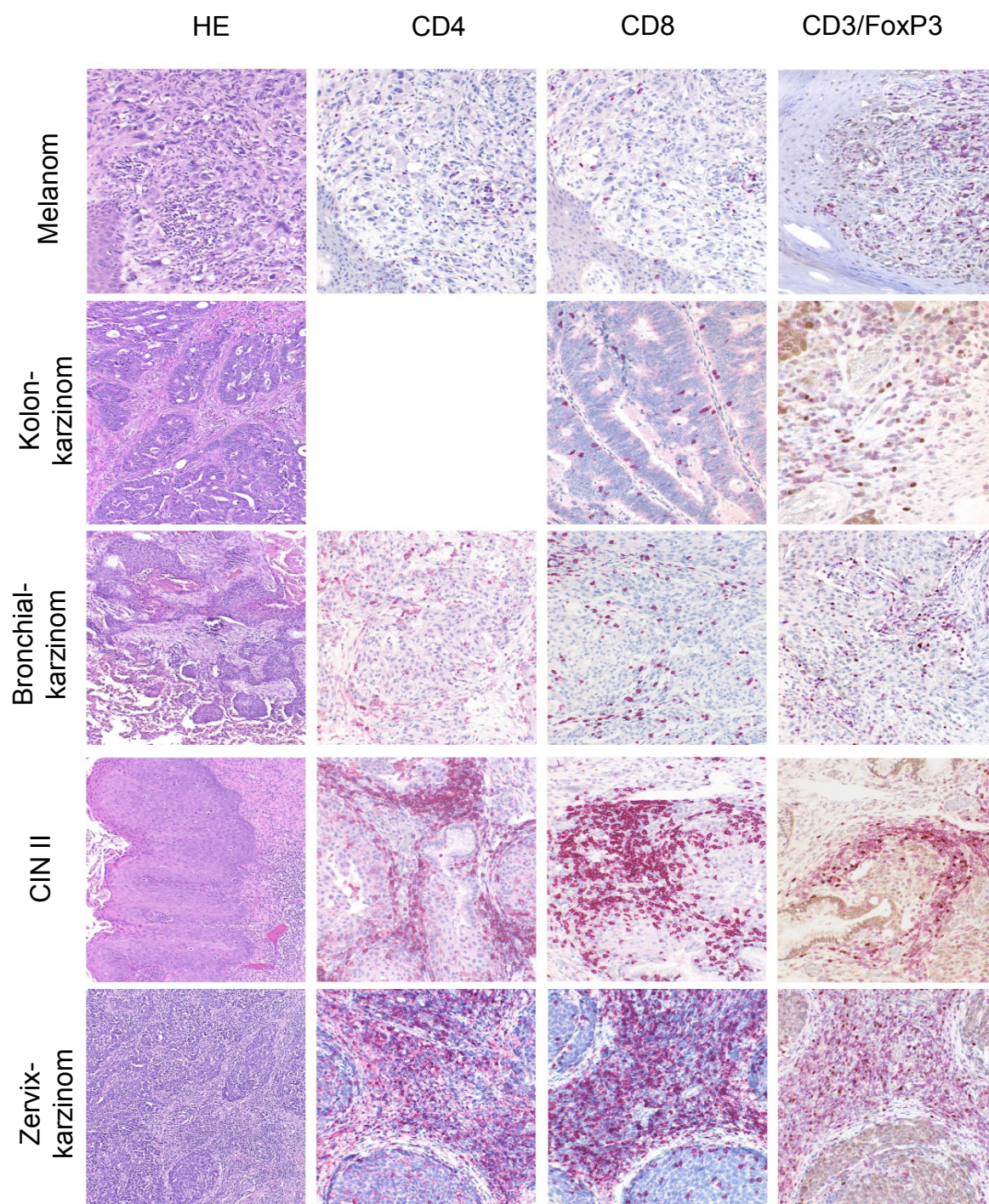
Unabhängig von der Tumorart, waren stets mehr als 70% der TIL im Stroma lokalisiert und ein großer Anteil davon exprimierte zudem den für die Entwicklung und Funktion von Treg essentiellen Transkriptionsfaktor FoxP3. Eine Subtypenanalyse der TIL unter besonderer Berücksichtigung von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen zeigte, dass in HPV-assoziierten Läsionen fünf Mal mehr T-Zellen infiltrierten als in andere Gewebe. Die höchsten Frequenzen an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ließen sich in Zervixkarzinomen dokumentieren, mit 85 CD4<sup>+</sup> und 80 CD8<sup>+</sup> Zellen/hpf. In CIN-Läsionen kamen durchschnittlich 25% weniger und in Melanomen bis zu 75% weniger CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor.



**Abbildung 31: Immunhistologische Charakterisierung infiltrierender Lymphozyten im Zervixkarzinom und in CIN als seinen Vorstufen.** Immunhistochemische Färbung von  $CD3^+$  und  $FoxP3^+$  Zellen in CIN und im Zervixkarzinom. Die linke Seite zeigt schematisch den Tumor-/Stroma-Aufbau der immunhistochemischen Schnitte.  $CD3^+$  Zellen heben sich in den Färbungen (rechte Seite) durch eine rote Färbung (LSAB/FastRed) hervor,  $CD3^+/FoxP3^+$  Zellen sind durch eine braune Färbung (POD/DAB) gekennzeichnet und exemplarisch durch schwarze Pfeile markiert. (Originalvergrößerung x100)

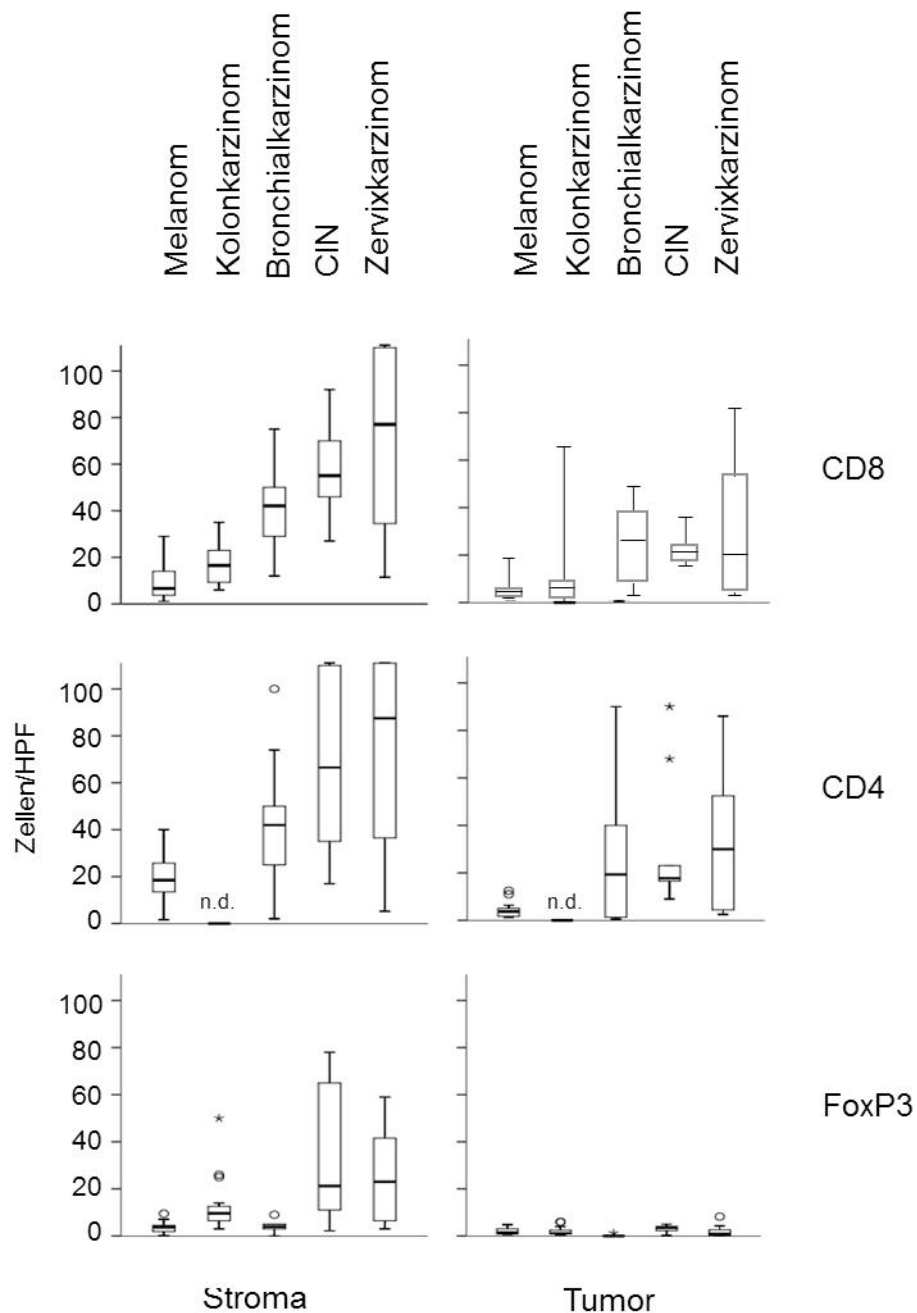
In den Geweben von Bronchialkarzinomen lagen die Frequenzen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen mit 40  $CD4^+$  und 42  $CD8^+$  Zellen/hpf im Vergleich zu Geweben von Kolonkarzinomen und Melanomen etwas höher. Die höchste Frequenz an  $FoxP3^+$  T-Zellen wiesen wiederum HPV-assoziierte Erkrankungen auf, wobei im Stroma von CIN-Läsionen 21  $FoxP3^+$  Zellen/hpf und in Zervixkarzinomen 23  $FoxP3^+$  Zellen/hpf gezählt wurden. Im Stroma von Bronchialkarzinomen wurden dagegen nur 4  $FoxP3^+$  Zellen/hpf gefunden. Die Verhältnisse von  $FoxP3^+CD3^+$  zu  $CD4^+$  T-Zellen wurde als Quotient der beiden Gruppen dargestellt. Werte von 0,32 in Zervixkarzinomen und 0,26 in CIN-Läsionen im Vergleich zu nur 0,09 in Melanomen wiesen außerdem darauf hin, dass auch der Anteil der  $FoxP3^+$  Zellen in den TIL der HPV-assoziierten Erkrankungen viel höher ist als in TIL anderer Neoplasien.





**Abbildung 32: Immunhistologische Charakterisierung Gewebe-infiltrierender Lymphozyten im Zervixkarzinom und anderen Tumorarten.** Hämatoxylin/Eosin- und immunhistochemische Färbungen in malignen Melanomen, Kolonkarzinomen, Bronchialkarzinomen, CIN-Läsionen und Zervixkarzinomen. Gefärbt wurden infiltrierende CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (rot; LSAB/FastRed) und CD3<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen (braun; POD/DAB). (Originalvergrößerung x100)





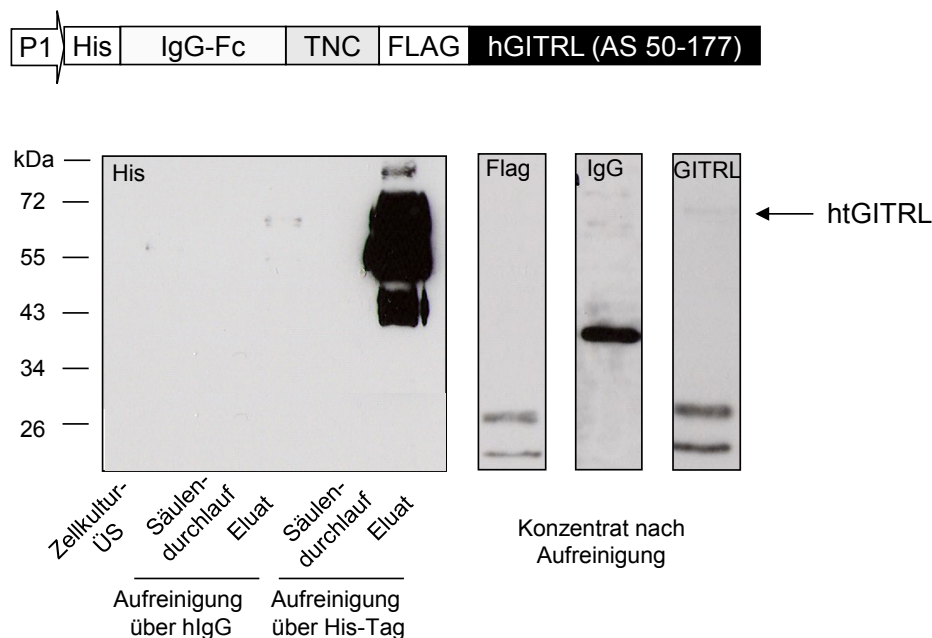
**Abbildung 33: Bestimmung der Frequenzen infiltrierender Lymphozyten im Zervixkarzinom und anderen Tumorarten.** Die Frequenzen von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen in malignen Melanomen der Haut (n=16), Kolonkarzinomen (n=20), Bronchialkarzinomen (n=9), CIN-Läsionen (n=10) und Zervixkarzinomen (n=12) wurden durch Bestimmung der Zellzahl/hpf in Gewebeschnitten, wie sie in der Abbildung 32 exemplarisch dargestellt sind, ermittelt. Dargestellt sind Median, Percentile, sowie min. und max. Value der Zellzahlen/hpf.

### 3.2.5 Herstellung eines rekombinanten Proteins zur Aktivierung des humanen GITR-Signalweges

Die Struktur des mtGITRL-Proteins wurde im folgenden Experiment für eine Anwendung im Menschen adaptiert. Grundlage des Proteinexpressionsvektors war der Vektor des

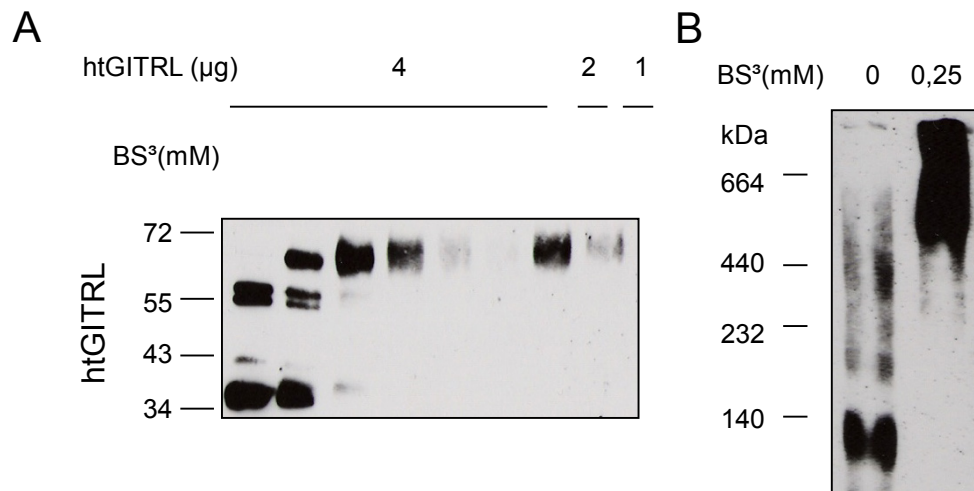
mtGITRL-Proteins. Die Sequenz des extrazellulären Bereiches des hGITRL ersetzte die Sequenz des mGITRL. Alle weiteren Strukturen einschließlich der Trimerisierungsdomäne blieben in diesem Vektor erhalten. Die Expression und Isolierung des humanen trimerisierenden GITRL-Proteins (htGITRL) erfolgte auf die gleiche Weise wie die des mtGITRL-Proteins (Abb. 34).

Das htGITRL-Protein mit 453 Aminosäureresten und der Glykosylierung im IgG-Fc ließ sich in der Western-Blot-Analyse mit einer Größe von ungefähr 60 kDa nachweisen. Auch in diesem Fall zerfiel das Protein einen Tag nach der Aufreinigung in zwei Bruchstücke, den hIgG-Bereich mit einer Größe von ungefähr 40 kDa und den hGITRL-Bereich mit einer Größe von ungefähr 20 kDa (Abb. 34).



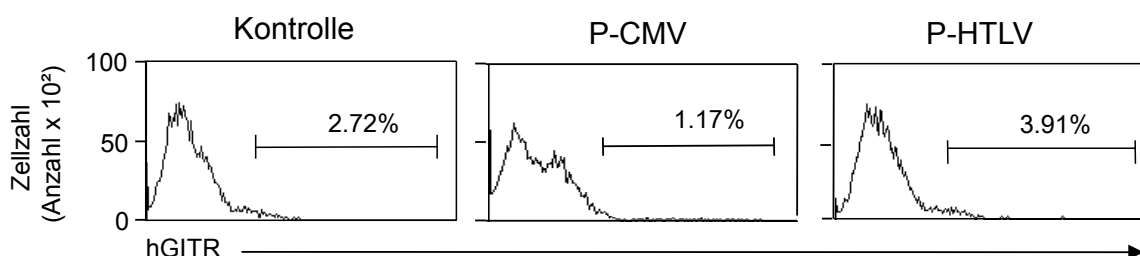
**Abbildung 34: Kontrolle der Expression und Aufreinigung von htGITRL.** Die Proteine wurden in HEK-S-Zellen exprimiert und über eine Protein-A-Sepharose- und Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Darstellung der Expressionskassette (obere Abbildung). Darstellung des htGITRL-Proteins in der Western-Blot-Analyse nach Expression (His-Antikörper, linke Abbildung) und 24 h nach Aufreinigung (Flag-Antikörper, hIgG-Antikörper, GITRL-Antikörper, rechte Abbildung).

Unmittelbar nach der Aufreinigung wurden die htGITRL-Proteine daher ebenfalls, wie die mtGITRL-Proteine, mit dem vernetzenden BS<sup>3</sup> stabilisiert (Abb. 35). Die Stabilisierung der htGITRL-Proteine war vergleichbar mit der Vernetzung der mtGITRL-Proteine und zeigte bei einer Linkerkonzentration von 250 nM und einer Menge von 4 µg gereinigtem Protein das effektivste Resultat.



**Abbildung 35: Stabilisierung der htGITRL-Proteine und Proteinkomplexe durch Vernetzung.** Proteinproben wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Linkermoleküls BS<sup>3</sup> vernetzt und im Western Blot dargestellt. Die Detektion des Kontrollproteins und des htGITRL-Proteins erfolgte durch die Antikörperfärbung mit einem His-Antikörper. A) Untersuchung verschiedener Vernetzungsgrade der Proteine B) Darstellung der Proteine im Western Blot nach der Auftrennung im nativen Gradientengel.

Die BS<sup>3</sup>-stabilisierten Proteine bildeten unter nativen Bedingungen Komplexe mit Größen ab 360 kDa, also Komplexe aus sechs und mehr Proteinen. Die nicht stabilisierten Proteine komplexierten zum größten Teil in Dimeren, mit einer Größe von 120 kDa. Für die Untersuchung der Funktionalität der Proteinkomplexe folgte ähnlich wie für die Untersuchung der mtGITRL-Proteine die Herstellung einer GITR<sup>+</sup> Zelllinie, die den humanen Rezeptor exprimiert. Dazu wurden zwei Plasmide mit verschiedenen Promotoren verwendet und miteinander verglichen (Abb. 36).



**Abbildung 36: Herstellung einer hGITR<sup>+</sup> Zelllinie.** Vergleich der Expressionsstärke des transgenen hGITR unter der Kontrolle zweier verschiedener Promotoren nach Transfektion und G418-Selektion in HEK-293T-Zellen. Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse nach Antikörperfärbung für den hGITR. Die prozentualen Anteile von hGITR<sup>+</sup> Zellen sind für die Beispiele angegeben.

Die Expression des hGITR in stabilen Zelllinien war unabhängig davon mit welchem Plasmid sie generiert wurden so stark herunterreguliert, dass der Rezeptor

durchflusszytometrisch nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wurde der Rezeptor noch 24 h nach einer Transfektion auf der Oberfläche dieser Zellen gefunden. Dieses System war für den Nachweis der Bindung der htGITRL-Proteine als Bedingung für die biologische Aktivität des trimerisierten Liganden noch nicht ausreichend.

### **3.3 Etablierung eines murinen Modells mit humanen Zervixkarzinomen**

#### **3.3.1 Entwicklung des Transplantationsprotokolls**

Um vitales Tumorgewebe und eine gleichmäßige Proliferation primärer Tumore im Tiermodell zu erzielen kamen verschiedene Protokolle für die Übertragung von Tumorzellen in den Mausstamm SCID Beige zur Anwendung.

Initial wurden Tumorwürfel primärer humaner Zervixkarzinome mit Volumina von 27-125 mm<sup>3</sup> transplantiert. Bei dieser Methode wurden die Versuchstiere betäubt, der Eingriffsbereich freilegt, die Haut eröffnet und nach Implantation des Tumorgewebes vernäht. Bei dieser Vorgehensweise waren nur etwa 20% der Transplantate vital und enthielten proliferierende Zellen. Die angewachsenen Tumore aus Transplantaten variierten trotz gleichen Ursprungs stark im Wachstum, ihrer Morphologie und der Vaskularisierung. In diesem Xenotransplantationsmodell vermehrtes Gewebe konnte nicht retransplantiert werden (0/8).

Wegen der uneinheitlichen Tumorentwicklung, die sich aus der Transplantation von Gewebestücken des Tumors ergab und eine serielle Analyse therapeutischer Agenzien nicht erlaubte, folgte die Anwendung einer anderen Transplantationstechnik auf der Basis vollständig suspendierter primärer humaner Zervixkarzinomzellen. Dazu wurden die vereinzelter Tumorzellen in verschiedenen Flüssigkeiten suspendiert und minimal invasiv transplantiert. Die Transplantation wurde ohne Betäubung durchgeführt und von den Versuchstieren im Vergleich zur oben genannten Methode gut vertragen. Nach Transplantationsversuchen fünf verschiedener Zervixkarzinome war das Wachstum von Tumorgewebe auch nach einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr äußerlich nicht erkennbar. Im Applikationsbereich sowie in den inneren Organen konnte ebenfalls keine Tumorentwicklung nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch die Transplantationstechnik anzupassen wurden Tumorzellaggregate bestehend aus 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Zellen verwendet. Für die Transplantation der Tumorzellaggregate war keine Betäubung erforderlich, sie erfolgte minimal invasiv. Diesen Eingriff vertrugen die Versuchstiere gut und die Infektionsraten waren im Vergleich zur ersten Methode reduziert. Mit dieser Technik bildeten sich in ca. 70% der transplantierten Tiere Zervixkarzinome (Tab. 19). Die für die Xenotransplantation genutzten Probenmaterialien wurden anhand histologischer Schnitte als Adenokarzinome, Karzinome des Plattenepithels bzw. neuroendokrine Karzinome klassifiziert.

**Tabelle 19: Merkmale transplanteder primärer humaner Zervixkarzinome.** <sup>#</sup>(-) kein Tumorwachstum, (+) Tumorwachstum; <sup>§</sup>(-) keine Retransplantation möglich, (+) Retransplantation bis zu vier Passagen

Art des primären Karzinoms	lfd. Nr. Transplantat	HPV-Typ	Proliferation <sup>#</sup>	Passage <sup>§</sup>
Adenokarzinom	1	16	+	+
	2	16	+	-
	3	16	+	-
	4	18	+	-
Plattenepithelkarzinom	5	16	+	+
	6	16	-	-
	7	16	-	-
	8	18	+	+
	9	33	-	-
neuroendokrines Karzinom	10	16	+	+

Das Wachstum der Tumore im Xenotransplantationsmodell wurde makroskopisch analysiert und ist in der Tabelle 19 durch die Proliferation und Passage dargestellt. Die Ermittlung der HPV-Typen erfolgte anhand einer Multiplex-HPV-Typisierung. Es wurden ausschließlich Zellen aus Tumoren transplantiert, die positiv für die Virustypen HPV16, HPV18 und HPV33 waren. Jedes der ausgewählten Tumorgewebe wurde auf mindestens drei Versuchstiere transplantiert.

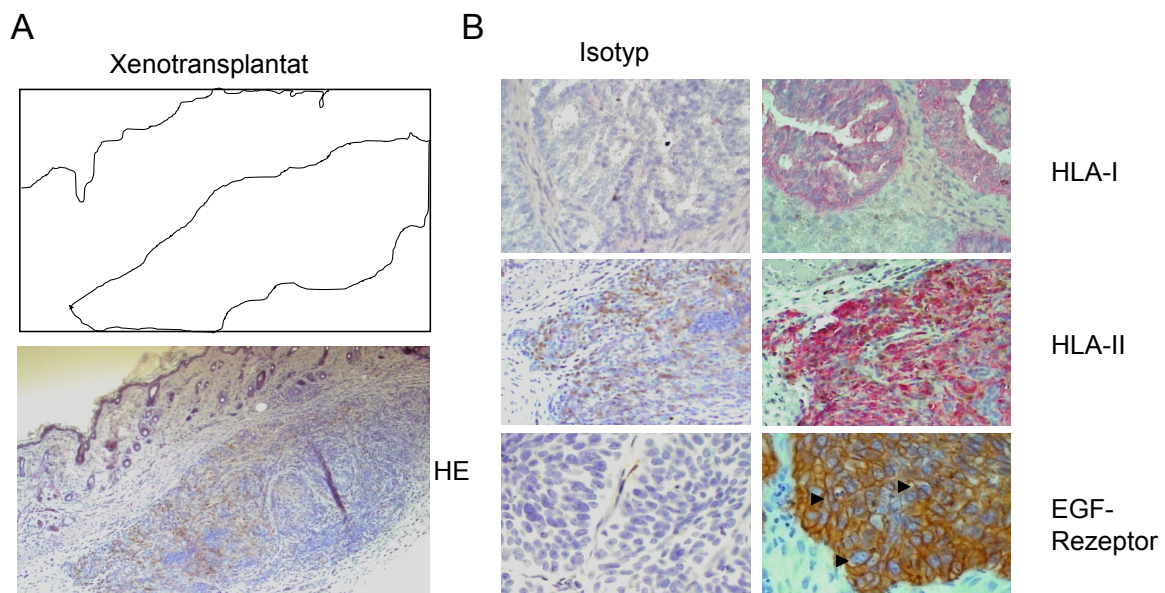
Innerhalb von 6 bis 8 Wochen nach Transplantation primären Tumormaterials war eine Progression des Gewebes am Übertragungsort sicht- oder tastbar. Innerhalb von 40 Tagen bis 5 Monaten entwickelten die Xenotransplantate Volumina von bis zu 1 cm<sup>3</sup>. Die Xenotransplantate wuchsen reproduzierbar und gleichmäßig, wobei das Wachstumsverhalten der drei verschiedenen Tumorarten unterschiedlich war. Während nur 40% der Plattenepithelkarzinome (2/5) anwuchsen, ließen sich nach Transplantation von Zellen der Adenokarzinome (4/4) sowie beim neuroendokrinen Karzinom (1/1) solide Tumoren nachweisen (Tab. 19). Das Wachstum des Tumorgewebes war unabhängig vom HPV-Typ.

Eine wichtige Voraussetzung für ein replikatives Xenotransplantationsmodell war der Erhalt der Merkmale des Zervixkarzinomgewebes nach Retransplantation. Vier dieser insgesamt 10 Primärtumore aus Xenotransplantaten induzierten nach Retransplantation neue Tumore. Passagierte Xenotransplantate erreichten Volumina von bis zu 1 cm<sup>3</sup> innerhalb von 40-60 Tagen. Die für die Entwicklung tastbarer Tumore notwendige

Zeitspanne unterschied sich bei frühen und späten Passagen nicht und war in jedem Fall kürzer als in der initialen Xenotransplantation. Interessanterweise konnten hier unabhängig vom Typ des ursprünglichen Karzinioms bevorzugt solche Tumoren mehrfach passagiert werden, die positiv für HPV16 waren (3/4). Damit stand ein reproduzierbares Transplantationsprotokoll für die Erzeugung von Xenotransplantaten humaner Zervixkarzinome in der Maus zur Verfügung.

### 3.3.2 Eigenschaften der transplantierten humanen Tumore

Im nächsten Schritt folgte eine (immun)histologische Analyse der aus primären humanen Zellen hervorgegangenen Tumore vor dem Hintergrund der Wirtsgewebe (Abb. 37).



**Abbildung 37: (Immun)Histologische Charakterisierung primärer Xenotransplantate.** Xenotransplantate von Adenokarzinomen wurden 5 Tage nach Transplantation frischer humaner Tumorzellen entnommen und immunhistologisch bewertet. A) Übersicht nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Weiße Pfeile verweisen auf die Kapselgrenze und schwarze Pfeile auf Gefäße. (Originalvergrößerung x50). B) Gewebsschnitte wurden mit spezifischen Antikörpern für die humanen Oberflächenantigene HLA-Klasse I, HLA-Klasse II und EGFR inkubiert und die Bindung der Antikörper über LSAB/FastRed (rot) oder POD/DAB (braun) sichtbar gemacht. Schwarze Pfeile verweisen exemplarisch auf Bereiche mit starker Zellteilung. Repräsentativ für drei Tumore. (Originalvergrößerung x200).

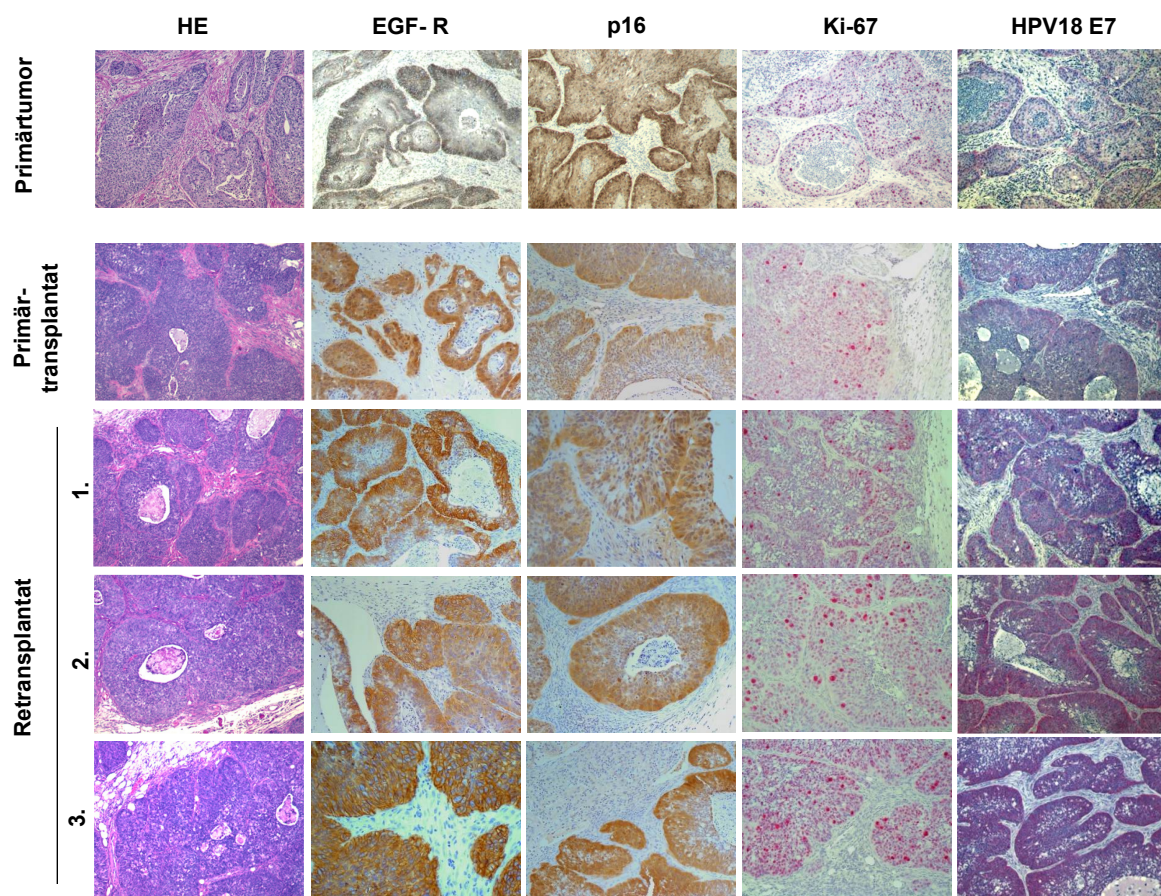
Die histologischen Übersichtsfärbungen zeigten bereits in den primären Xenotransplantaten eine starke Vaskularisierung und eine Gewebeeinkapselung (Abb. 37A).

Eine immunhistologische Beschreibung bestätigte über die Expression von HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Molekülen sowie des humanen EGFR in den Bereichen des Tumors,



dass die entstandenen Karzinome tatsächlich aus den transplantierten primären humanen Tumorzellen hervorgegangen waren und sich vom umliegenden Mausegewebe gut abgrenzen (Abb. 37B). In allen Tumoren war eine starke mitotische Aktivität zu erkennen, die sich anhand vielfach sichtbarer Zellteilungsprozesse nachweisen ließ (Abb. 37B).

Ob die typischen Eigenschaften proliferierender Zervixkarzinome über weitere Passagen in naive Mäuse erhalten blieben, erwiesen die folgenden immunhistochemischen Untersuchungen (Abb. 38).



**Abbildung 38: Tumormerkmale von Adenokarzinomen über mehrere Passagen im murinen Xenotransplantationsmodell.** Hematoxylin/Eosin-Färbung und immunhistochemische Färbungen für verschiedene Tumormarker (EGFR, Zervixkarzinommarker p16, virales Onkogen HPV18E7, Proliferationsmarker Ki-67) in Gewebeschnitten von Xenotransplantaten bis zur vierten Passage. Die Bindung der primären Antikörper wurde entweder über LSAB/FastRed (rot) oder über POD/DAB (braun) sichtbar gemacht. (Originalvergrößerung x100).

Anhand immunhistochemischer Färbungen zeigte sich, dass spezifische Tumormarker wie der EGFR und die für Zervixkarzinome spezifische Überexpression des p16 in frühen und späten Passagen erhalten blieben (Abb. 38). Der anhand einer PCR bestimmte HPV-Typ



des Tumors sowie die Expression des viralen Onkogens HPV18E7 blieben in den Retransplantaten unverändert. Die über Ki-67 nachgewiesene Proliferation des Tumorgewebes wurde durchgängig in mehreren aufeinander folgenden Passagen beobachtet (Abb. 38).

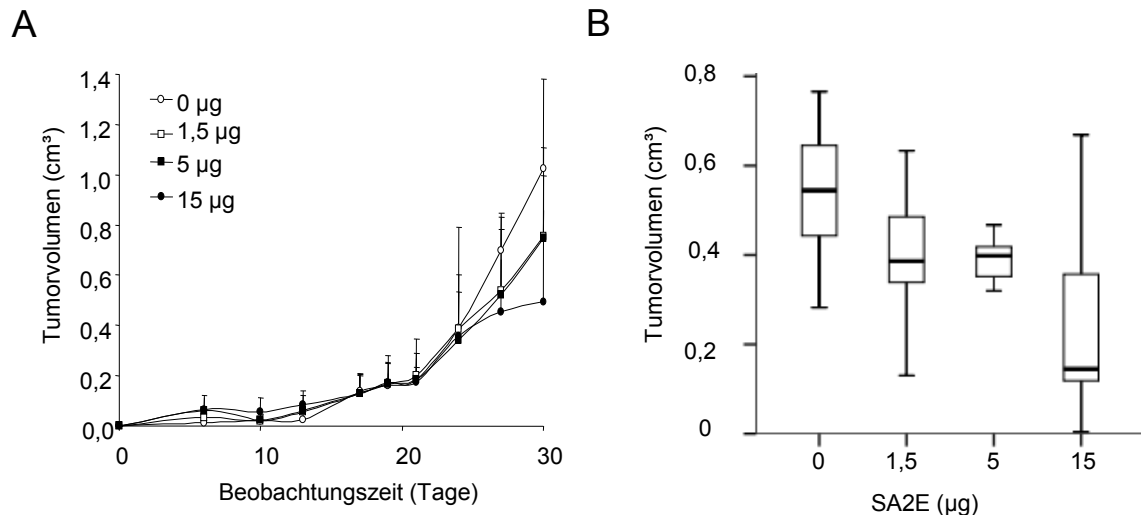
Humanes Tumorgewebe ließ sich also mit Hilfe dieser Transplantationstechnik auf der SCID-Beige-Maus ohne den Verlust Tumor-spezifischer Merkmale vermehren, was unter anderem die Analyse Tumor-therapeutischer Agenzien in umfangreichen experimentellen Ansätzen ermöglicht.

### **3.3.3 Wirkung des Immuntoxins SA2E auf humane Zervixkarzinome im Xenotransplantationsmodell**

Somit stand das Xenotransplantationsmodell für die Untersuchung der Wirkung von beispielsweise Immuntoxinen zur Behandlung von Zervixkarzinomen zur Verfügung. Da es sich bei den Tumoren um EGFR<sup>+</sup> Zervixkarzinome handelte, die den Rezeptor nachweisbar über mehrere Passagen exprimierten, eignete sich das Xenotransplantationsmodell besonders gut für die Untersuchung des Immuntoxin SA2E, dessen Zielstruktur der EGFR ist.

Das zu diesem Zweck expandierte Tumorgewebe wurde auf 20 Versuchstiere verteilt. Nachdem die transplantierten Tumore Volumina von 125 mm<sup>3</sup> erreicht hatten begann die Behandlung. Drei von vier Gruppen erhielten verschiedene Konzentrationen des SA2E, die vierte Gruppe erhielt als Kontrolle nur PBS. Die Applikation erfolgte sechsmal alle drei Tage und begann an Tag 13 nach Tumortransplantation. Das Tumorstadium wurde über 30 Tage beobachtet. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine schnelle Zunahme der Tumorstadium innerhalb von 30 Tagen (Abb. 39).

In den SA2E behandelten Versuchsgruppen konnte ab Tag 23 eine verminderte Volumenzunahme der Tumore verzeichnet werden. Dreißig Tage nach Tumortransplantation ließen sich in den mit einer Dosis von 1,5 µg und 5 µg behandelten Versuchsgruppen Tumorstadium von 0,39 cm<sup>3</sup> bis 0,40 cm<sup>3</sup> beobachten. In der Kontrollgruppe wuchsen die Tumore dagegen auf Volumina von durchschnittlich 0,54 cm<sup>3</sup> an. Tumore der Versuchsgruppe, behandelt mit 15 µg SA2E, wiesen im Vergleich zu den anderen Gruppen die geringsten Volumina mit durchschnittlich 0,26 cm<sup>3</sup> auf.



**Abbildung 39: Tumorwachstum im Xenotransplantationsmodell unter Einfluss eines Immuntoxins.** Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen des therapeutischen Immuntoxins SA2E. Die Applikation des Proteins begann an Tag 13 nach Transplantation und erfolgte 6 Mal alle drei Tage. A) Dokumentation der Tumolvolumina über einen Zeitraum von 30 Tagen. Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=5$  B) Darstellung des Tumolvolumens an Tag 27. Dargestellt sind Median, Percentile, sowie min. und max. Value der Tumolvolumen.

Die Unterschiede im Wachstum der Tumore zeigten sich jedoch nur unmittelbar unter der Behandlung mit SA2E bis zum Tag 33. Danach nahmen die Volumina der Tumore aller Versuchsgruppen kontinuierlich zu.

Die Versuchsergebnisse verdeutlichten, dass sich die Tumolvolumina während des Zeitraums der Applikation mit steigender SA2E-Konzentration tendenziell langsamer vergrößern als ohne EGFR-spezifische Behandlung. Die Untersuchung der Wirkung des Immuntoxins SA2E war ein ausgewähltes Beispiel für die Anwendung des in dieser Arbeit etablierten Xenotransplantationsmodells.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Präambel**

Bei der Kontrolle und Regression von Tumoren übernehmen T-Zellen, insbesondere CTL entscheidende Aufgaben. Zielstrukturen der T-zellvermittelten Anti-Tumorantwort sind hier Tumorantigene. HPV-assoziierte Tumorerkrankungen, wie das Zervixkarzinom, grenzen sich durch ihre spezifischen Tumorantigene, die nicht wie in den meisten Tumoren zelleigene sondern virale Proteine sind und somit Neoantigene darstellen, besonders ab [1]. Aufgrund dieser gesonderten Erkennungsmerkmale wurde gegen HPV-Tumore bereits eine Vielzahl therapeutischer Impfstrategien entwickelt und in vorklinischen Untersuchungen und klinischen Studien getestet [81]. Obwohl die Aktivierung zellulärer Immunantworten beschrieben werden konnte, ließ sich meist keine und wenn, dann nur eine transiente Tumorregression beobachten [198]. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den vorklinischen Untersuchungen, der in unserer Arbeitsgruppe hergestellten HPV-Vakzine Ad-p14 dokumentiert. Um herauszufinden, inwieweit eine Vakzine-aktivierte Immunantwort gleichzeitig eine effektive Tumorimmunantwort gegen HPV-assoziierte Tumore darstellen kann, wurden in den Studien dieser Arbeit verschiedene immunologische Aspekte, wie beispielsweise die Aktivierbarkeit HPV-spezifischer CTL oder die Rolle anderer Immunzellen bei der Tumorentwicklung näher betrachtet.

### **4.2 Die Aktivierung HPV-spezifischer CTL durch Vakzinierung mit Ad-p14**

Ziel der HPV-Tumorvakzinierung ist die Aktivierung T-zellvermittelter Immunantworten, insbesondere die Aktivierung HPV-spezifischer CTL, die Tumorzellen erkennen und zerstören. Immunologisch betrachtet verläuft eine Vakzinierung ähnlich wie eine akute Virusinfektion. Vakzine- oder Virusantigene werden zunächst von APC aufgenommen und in einem kostimulatorischen Kontext präsentiert. Spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden durch die Bindung des Antigenkomplexes auf den APC aktiviert, expandieren und können dann Vakzine- bzw. Virus-infizierte Zellen erkennen und eliminieren [199,200,201]. Nach der Zerstörung infizierter Zellen durchläuft die Mehrzahl der T-Zellen die Apoptose, eingeleitet durch verschiedene regulatorische Mechanismen. Nur wenige *Memory* T-Zellen mit den spezifischen TCR verbleiben, die sich bei einem erneuten Antigenkontakt schneller und stärker aktivieren lassen [202].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Wirkung von Ad-p14 im Mausmodell beschrieben die maßgeblich an der zellulären Antwort beteiligten CTL anhand einer HPV-spezifischen Sekretion von IFN- $\gamma$  und der Lyse HPV<sup>+</sup> Zielzellen. Zellen mit diesen Eigenschaften ließen sich in Lymphozytenpopulationen Ad-p14-vakzinierter Mäuse nachweisen. Gleichzeitig verhinderte die Vakzinierung das Anwachsen HPV<sup>+</sup> Tumorzellen. Mäuse, die mit einem Kontrollvirus geimpft waren und keine HPV-spezifischen CTL zeigten, entwickelten Tumore nach der Applikation HPV<sup>+</sup> Tumorzellen.

Studien zur Wirkung anderer HPV-Vakzine, die auf Lebendvektoren, Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren oder Zellen basieren und sich ebenfalls gegen die HPV-Antigene E6 und E7 richten bestätigten die Aktivierung einer HPV-spezifischen Immunantwort und einen dadurch bestehenden Schutz vor Entwicklung HPV<sup>+</sup> Tumore in Mäusen [81]. Auch in Studien im Menschen konnten nach Vakzinierung mit verschiedenen Impfstoffen HPV-spezifische T-Zellantworten nachgewiesen werden [81].

Die in dieser Arbeit aufgezeigten vorklinischen Untersuchungen zu Ad-p14 im Menschen erfolgten in *in-vitro*-Experimenten mit Zellen gesunder Donoren, DC die sich zu funktionellen APC reifen und effektiv mit der Vakzine Ad-p14 transduzieren ließen. Genexpressionsanalysen dieser DC zeigten, dass das p14-Transgen exprimiert wurde. FACS-Analysen bestätigten auch die Anwesenheit der wichtigsten kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86. Mit Hilfe dieser Eigenschaften verfügten die DC über alle Voraussetzungen T-Zellen HPV-spezifisch zu aktivieren. Nach den Ergebnissen der Versuche im Mausmodell sollten mit diesen DC als APC *in vitro* HPV-spezifische CTL generierbar sein.

Die CTL sollten anhand der spezifischen IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Surrogatparameter und der direkten HPV-spezifischen Zytotoxizität, für deren Nachweis in unserer Arbeitsgruppe mit dem VITAL-FR-Test [195] und der PTF [196] zwei sensitive durchflusszytometrische Tests entwickelt wurden, beschrieben werden. Trotz wiederholter Stimulation von PBMC mit Ad-p14-transduzierten autologen DC ließen sich aus den resultierenden Linien keine HPV-spezifischen CTL-Antworten detektieren. Es ist denkbar, dass in den PBMC gesunder, nicht geimpfter Spender T-Zellen fehlten, die HPV-spezifisch reaktiviert werden können.

*In vivo* treten APC, die nach einer Vakzinierung Antigene aus dem Impfstoff auf unterschiedliche Weise präsentieren, durch ständige Zirkulation von Blut und Lymphe mit vielen naiven T-Zellen in Kontakt. So können sie auch, wie zum Beispiel in den

Vakzinestudien im Mausmodell, T-Zellen mit geringen Vorläuferfrequenzen aktivieren. In den durch die Kulturbedingungen bestimmten *in-vitro*-Ansätzen mit menschlichen Zellen begrenzte sich die Anzahl der Zellen in den PBMC-Präparationen. Die aus den Ergebnissen hervorgehenden Beobachtungen sprechen zudem gegen die Annahme, dass sich naive T-Zellen durch erstmaligen Antigenkontakt *in vitro* spezifisch aktivieren lassen [192,203]. Sie unterstützen die Hypothese, dass dieses so genannte *Priming* nur *in vivo* erfolgen kann, wobei das Antigen die sekundären lymphatischen Organe erreicht haben muss [204].

Die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung HPV-spezifischer *Memory* CTL ist aufgrund der geringen Zellzahlen in den Versuchsansätzen und der Durchseuchungsrate von 10% für HPV generell und für die in der Vakzine Ad-p14 repräsentierten Gene aus den HPV-Typen 16 und 18, die 0,4 bis 44% der HPV<sup>+</sup> Personen betreffen, eher gering [205]. So konnten auch in anderen Studien HPV-spezifische *Memory* CTL selten in willkürlich ausgewählten Donoren nachgewiesen werden [206,207]. Demgegenüber konnten in HPV-infizierten Patienten HPV-spezifische CTL detektiert werden [95,208]. Bei Virusinfektionen mit hoher Durchseuchungsrate in der Normalbevölkerung, wie CMV (50 bis 90%, [209]) und das Influenza A-Virus konnten in *in-vitro*-Versuchen nach Stimulation von HLA-A2<sup>+</sup> PBMC mit reifen autologen DC, die mit immundominanten HLA-A2-restringierten Peptiden beladen waren, Virus-spezifische CTL signifikant nachgewiesen werden.

Ebenso kann der fehlende Nachweis HPV-spezifischer CTL in den *in-vitro*-Versuchen nach Stimulation humaner Zellen mit Ad-p14-transduzierten autologen DC seine Ursachen in einem sich aus der natürlicherweise so nicht vorkommenden Zusammensetzung des Vakzinierungsgens p14 resultierenden und ein zum HPV-Wildtyp verändertes Peptidmuster haben. Die Konstruktion der p14-Sequenz kann so unbeabsichtigt den Effekt eines *Immune Escapes* im Menschen herbeigeführt haben, wie er beispielsweise durch Mutationen in HIV-Varianten auftritt [210].

Daher erscheint es sinnvoll weitere Untersuchungen von Ad-p14 zunächst im Hinblick auf die Präsentation der HLA/Peptid-Epitope im Menschen durchzuführen. Daraus kann ein Impfstoff zur Aktivierung humaner HPV-spezifischer CTL optimiert werden. Sein stimulatorisches Potential für HPV-spezifische funktionelle CTL und die Wirkung auf HPV-Tumoren im Menschen kann dann in Impfstudien analog zum Mausmodell oder an Blutspenden von Personen, die bereits eine HPV-Infektion ausgeheilt haben getestet werden.

### 4.3 Die Rolle der T-Zellen in HPV<sup>+</sup> Tumoren

Sind neben den CTL auch andere Zellen der erworbenen Immunität an der Tumorentwicklung beteiligt? Verschiedene Untersuchungen beschreiben die Entstehung und Progression von Tumoren im Zusammenhang mit inflammatorischen Reaktionen [29,211,212]. Nachweislich wurden bei Tumorerkrankungen, insbesondere in den Tumorgeweben sowohl Tumor-spezifische Antikörper als auch verschiedene Immunzellen, meistens TIL detektiert [211]. Besonders hohe TIL-Frequenzen wurden bisher immer wieder in Virus-induzierten Tumoren dokumentiert [213]. TIL-Frequenzen, die in dieser Arbeit immunhistologisch an Gewebeschnitten bestimmt wurden, waren in HPV-Virus-induzierten Zervixkarzinomen zwei bis drei Mal höher als in anderen Tumorerkrankungen, wie Kolonkarzinomen, Melanomen oder Bronchialkarzinomen. Das bestätigte eindrücklich die Befunde anderer Arbeitsgruppen [208,214].

Doch welche Rolle spielen diese Zellen im Tumor? Die immunologischen Umstände und Eigenschaften der T-Zellen in Tumoren, insbesondere in Virus-induzierten Tumoren sind vergleichbar mit denen in chronischen Virusinfektionen [215] und unterscheiden sich grundlegend von denen in akuten Virusinfektionen oder eben auch nach prophylaktischen Vakzinierungen. Bei einer akuten Virusinfektion ist das Immunsystem erstmalig und über einen begrenzten Zeitraum mit dem Antigen konfrontiert. Ein erneuter Kontakt mit dem gleichen Antigen, führt zu einer schnelleren und stärkeren T-Zellantwort. Bei einer chronischen Virusinfektion bzw. bei Virus-induzierten Tumorerkrankungen sind die viralen Antigene permanent präsent. In chronischen Virusinfektionen durchlaufen Virus-spezifische T-Zellen, insbesondere die CD8<sup>+</sup> T-Zellen daher verschiedene Stufen einer Erschöpfung bis hin zum Zelltod [216,217,218]. Im Verlauf dieser Erschöpfung verlieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihre immunologischen Fähigkeiten, zum Beispiel die Produktion inflammatorischer Zytokine oder die Antigen-spezifische Proliferation und Zytolyse [216]. Auch Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen schränken die Produktion inflammatorischer Zytokine ein und beginnen immunsuppressive Zytokine wie IL-10 zu sezernieren [219]. Zusätzlich hemmt ein komplexes Netzwerk regulatorischer Mechanismen die für die Eliminierung des Pathogens erforderliche Immunantwort. Eine besondere Gruppe von T-Zellen, die Treg sorgen in einem akuten Geschehen für Beendigung einer pro-inflammatorischen Immunantwort. Im Verlauf chronischer Viruserkrankungen schränken diese Regulatoren die immunreaktiven Eigenschaften anderer T-Zellen ein und forcieren ihre Erschöpfung, die Etablierung der viralen Persistenz und letztendlich die

Tumorentwicklung [220]. In dieser Arbeit konnten auch in CIN-Läsionen, einer chronischen HPV-Viruserkrankung und der Vorstufe von Zervixkarzinomen höhere Infiltrationsfrequenzen von  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $FoxP3^+$  nachgewiesen werden als in Virus-negativen Tumoren. Die höchsten Infiltrationsraten zeigten sich in Zervixkarzinomen. Besonders auffällig war die hohe Anzahl an  $FoxP3^+$  T-Zellen in den Zervixkarzinomgeweben. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigte, dass eine höhere Treg-Anzahl in Zervixkarzinompatienten mit einer schlechteren Prognose korreliert [133].

Wie lassen sich die Unterschiede in den TIL-Frequenzen in humanen HPV<sup>+</sup> und nicht-viralen Tumoren erklären? Denkbar ist, dass die abweichenden TIL-Frequenzen durch die unterschiedliche Tumorentwicklung und Art der Antigene verursacht sind. Da es sich bei den meisten Tumorantigenen um zelleigene Proteine handelt, werden T-Zellantworten während der T-Zellreifung zensiert und eingeschränkt. Hoch-affine T-Zellen, die spezifisch für solche Autoantigene sind, werden bereits während der Selektion im Thymus deletiert oder besitzen regulatorische Eigenschaften. Dagegen sind Tumorantigene HPV-assoziiierter Neoplasien viralen Ursprungs, also Neoantigene. Eine Einschränkung der T-Zellantwort besteht somit vor der primären Virusinfektion noch nicht. Hinzu kommt, dass sich HPV-assoziierte Tumore aus einer chronischen Infektion, also in einer stark inflammatorischen Umgebung entwickeln. Das begünstigt zusätzlich die Infiltration von Lymphozyten.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen der HPV<sup>+</sup> Tumore im Mausmodell zeigten dort wenige  $CD8^+$  T-Zellen, aber Analogien zu den Frequenzen, der in humanen Zervixkarzinomen nachgewiesenen  $CD4^+$  und  $FoxP3^+$  T-Zellen. Die Tumor-immunologischen Umstände - bezogen auf die TIL - sind somit nicht direkt mit humanen Zervixkarzinomen vergleichbar. Dies ergibt sich aus wesentlichen Unterschieden in der Tumorgenese. Während sich die Tumore der Maus aus einmalig applizierten HPV<sup>+</sup> Tumorzellen entwickeln, resultieren humane Zervixkarzinome aus dem langfristigen Prozess einer chronischen Infektion [6].

Therapieansätze für Zervixkarzinome lassen sich bisher nur in klinischen Studien, also direkt am Menschen untersuchen. Die Varianz auf HLA-Ebene und auf der Seite des Virus erfordern für belastbare Aussagen sehr große Kohorten. Diese könnten durch vorklinische Studien erleichtert werden, in denen humane Immunzellen in ihrer Wechselwirkung mit dem Wachstum humaner Zervixkarzinome betrachtet werden können. Dazu wurde in

dieser Arbeit ein humanisiertes Mausmodell etabliert. Mit Hilfe einer neu entwickelten Transplantationstechnik, die in der Durchführung einfach und im Vergleich zu bekannten Transplantationsmethoden für solide Gewebe schonend für das Versuchstier ist, ließ sich humanes Zervixkarzinomgewebe in beschränkt immunkompetenten SCID-Beige-Mäusen mit reduziertem Repertoire endogenen T- und B-Zellen anreichern und vermehren. Bei der Vermehrung der Gewebe blieben die Tumor-spezifischen Merkmale über mehrere Passagen erhalten. Das erlaubt grundsätzlich die Analyse Tumor-therapeutischer Agenzien. Aufgrund der über mehrere Passagen nachgewiesenen Expression des EGFR in einem HPV<sup>+</sup> Tumor ließ sich das EGFR-spezifische Immuntoxin SA2E in diesem Xenotransplantationsmodell gut testen. Mit steigender Konzentration konnte das SA2E mindestens unmittelbar während der Behandlung das Tumorwachstum einschränken.

Die Wirkung humaner Tumor-spezifischer T-Zellen wurde in diesem Tiermodell nicht beschrieben. Weil in vergleichbaren Transplantationsmodellen für Leukämie oder Brustkrebs spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten [221,222] ist davon auszugehen, dass sich dies auch für HPV-assoziierte humane Tumoren bestätigen lässt.

#### **4.4 T-Zelleigenschaften und Entwicklung HPV<sup>+</sup> Tumore in Ad-p14-vakzinieren Mäusen**

Wie in den Versuchen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine Vakzinierung mit Ad-p14 in naiven Mäusen zur Aktivierung HPV-spezifischer CTL. Tumorzellen, die den Mäusen nach Vakzinierung appliziert wurden, sind vollständig abgestoßen worden. Was passiert jedoch, wenn Mäuse vakziniert werden in denen sich bereits ein Tumor entwickelt hat? Kann eine Vakzine-aktivierte Immunantwort gleichzeitig eine effektive Tumoreimmunantwort sein und spielen TIL, insbesondere regulatorische T-Zellen dabei eine Rolle? Um diese Fragen zu beantworten wurde im Mausmodell mit etablierten HPV<sup>+</sup> C3- oder TC1-Tumoren die Tumorentwicklung und HPV-spezifische T-Zellantworten nach Vakzinierung in einem quasi therapeutischen Ansatz analysiert.

Bemerkenswert waren die unterschiedlichen Verläufe des Wachstums von TC1- und C3-Tumoren. C3-Tumore regredierten und wurden innerhalb von fünf Tagen vollständig abgestoßen. Tumore, die sich aus TC1-Zellen entwickelten wurden nicht abgestoßen. Die abweichende Tumorentwicklung könnte sich aus den unterschiedlichen Eigenschaften der Zelllinien ergeben, denn C3-Zellen exprimieren das gesamte HPV16-Genom sowie das Ras-Onkogen [171]; TC1-Zellen nur die Onkogene HPV16 E6/E7 und Ras [172].



Dass es sich bei der Regression der C3-Tumore um eine T-zellabhängige Rückbildung handelte, konnte in Mäusen nachgewiesen werden, die nach Transplantation von Milzzellen Ad-p14-vakzinierter Mäuse C3-Tumore abstießen. Ähnliche Ergebnisse zur CTL-vermittelten Tumorabstoßung dokumentierten auch andere Arbeitsgruppen [223]. Die T-Zellantwort, die durch die Ad-p14-Vakzinierung aktiviert wurde, war somit bei C3-Tumoren ausreichend um diese vollständig zu zerstören.

TC1-Tumore wuchsen in zwei Intervallen aus, die durch eine zwischenzeitliche Regression unterbrochen waren. Starke Unterschiede in der Tumorentwicklung nach Vakzinierungen bestätigten auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [224,225]. Für zweiphasige Wachstumsverläufe wurden oft verschiedene Ursachen beschrieben. In den meisten Fällen kam es zu gezielten Veränderungen der immunologischen Eigenschaften von Tumorzellen, wie zum Beispiel der Verlust des Tumorantigens [226] oder der MHC-Klasse I-Expression, die eine Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem stark einschränken [227]. Untersuchungen zu immunologischen Eigenschaften im zweiphasigen Wachstumsverlauf der TC1-Tumore zeigten, dass keine signifikanten Unterschiede im MHC-Klasse I-Expressionsprofil der Tumorzellen vor und nach Regression auftraten. Auch die Expression des Tumorantigens HPV16E7 ließ sich zu beiden Zeitpunkten nachweisen, womit auch der in Tumormodellen nachgewiesene Verlust der Tumorantigene [228] ausgeschlossen werden konnte. Unterschiede traten dagegen in den Frequenzen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TIL vor und nach Regression auf. Vor Regression konnten ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. Während der Tumorregression waren die CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe um das Dreifache erhöht. Gleichzeitig stellte sich eine Vermehrung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen dar. Vor und nach Regression waren nur wenige CD4<sup>+</sup> T-Zellen und keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar. Die aktivierte T-Zellantwort und T-Zellinfiltration konnte nur in einem definierten Zeitraum, und zwar genau während der Regression beobachtet werden. Die T-Zellantwort wurde somit wahrscheinlich herunterreguliert bevor alle Tumorzellen zerstört waren. In den wiederauswachsenden Tumoren verminderte sich aufgrund dieser Regulation die TIL-Anzahl und war vergleichbar mit der Anzahl in Tumoren vor Vakzinierung. Die hierbei beobachteten regulatorischen Mechanismen lassen sich auch in chronischen Virusinfektionen nachweisen [229]. Sie schützen das Gewebe vor einer massiven Inflammation und Zerstörung [204]. In Tumoren werden beispielsweise, die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine oder die vermehrte Anzahl von Treg als *Tumor-Escape-Mechanismen* bezeichnet [48,49,50,51,52].

Um zu testen, inwieweit diese Mechanismen umgangen oder überwunden werden können, ist in den weiteren Untersuchungen der Zeitpunkt und die Häufigkeit der Vakzinierung verändert worden. Es zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Vakzinierung in Abhängigkeit zur Tumoretablierung bzw. Entwicklung und Größe eine zentrale Rolle spielt. Eine frühe Immunisierung, zwei oder vier Tage nach Applikation von Tumorzellen, führte zu einer kompletten Regression der Tumore in den Versuchstieren, also zu einer wirksamen Tumor-Vakzinierung mit Ad-p14. Die Vakzinierung zu einem späteren Zeitpunkt schränkte das Wachstum der Tumore im Vergleich zu den Kontrollen zwar ein konnte aber ihre Ausbildung nicht verhindern. Eine mehrfache Wiederholung der Impfung zu späten Zeitpunkten verbesserte die Tumorzerstörung nicht. Die Tumore wuchsen in diesen Tieren zum Teil schneller als in einfach geimpften Mäusen. Vielfachvakzinierungen in anderen Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Reduktion des therapeutischen Effektes, der mit dem Anstieg der Treg-Frequenz einherging [230]. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass sich ähnlich wie bei einer chronischen Viruserkrankung, auch im Verlauf einer viralen Tumorerkrankung die Erschöpfung der T-Zellen verstärkt [215,231]. Eine Aktivierung bzw. Reaktivierung der T-Zellen durch Vakzinierung kann sogar die Erschöpfung der T-Zellen forcieren und so das Wachstum des Tumors begünstigen. Unterstützt wird dieser Prozess durch die mit der Tumorentwicklung einhergehenden Vaskularisierung, Angiogenese und Rekrutierung immunregulatorischer Zellen.

Demzufolge sind die Ausgangssituation im Tumorgewebe, sowie der Status der T-Zellen entscheidend für die Wirksamkeit einer Vakzinierung.

#### **4.5 Verbesserung der Vakzine-aktivierten T-Zellantwort und Tumorregression in Mäusen**

##### **4.5.1 Kombination der Vakzine mit Immunmodulatoren**

Immunmodulatoren können durch ihre pro- oder anti-inflammatorischen Eigenschaften eine T-Zellantwort unterstützen bzw. regulatorische Mechanismen im Tumorgewebe blockieren oder aufheben. Solche Moleküle mit Angriffspunkten auf verschiedenen Ebenen der Wechselwirkung von Tumor und Immunsystem wurden in weiteren Versuchen dieser Arbeit mit der Vakzine Ad-p14 in Mäusen kombiniert und ihr Einfluss auf das Wachstum HPV<sup>+</sup> Tumore beobachtet. Kombinationen mit IFN- $\alpha$  [232] oder den depletierenden Antikörpern CD4 [230,233] und GITR (DTA-1) [125,234] steigerten die

Tumorregression durch die therapeutische Vakzinierung mit Ad-p14. Eine vollständige Zerstörung der Tumorgewebe in allen Versuchstieren wurde nach der Behandlung mit DTA-1 beobachtet. In den Milzzellen dieser Versuchstiere erhöhte sich durch diese Behandlung die Gesamtzahl HPV-spezifisch reaktiver CTL, die Anzahl von FoxP3<sup>+</sup> Treg veränderte sich dagegen nicht. Da die Tumore zum Zeitpunkt der Analyse der T-Zellen in der Ad-p14/DTA-1-behandelten Versuchsgruppe makroskopisch und mikroskopisch nicht mehr detektierbar waren, wurden keine Untersuchungen zu den immunologischen Eigenschaften der TC1-Tumore, insbesondere die Beschreibung CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt.

Bekannt ist, dass der Antikörper DTA-1 den GITR der Maus, welcher in hohem Maße auf Treg dargestellt wurde, bindet und aktiviert [235]. In den Geweben von C3-Tumoren aus Mäusen, die nur mit DTA-1 behandelt wurden konnten im Vergleich zu Geweben aus Kontrolltieren 10fach mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen und 5fach weniger FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt wurde nach DTA-1-Behandlung eine Anreicherung von T-Zellen beobachtet. Allerdings wird die Wirkungsweise des Antikörpers in verschiedenen Arbeiten kontrovers diskutiert. Einerseits werden Blockierung oder Deletion von Treg beschrieben [236], andererseits blieben Treg unbeeinflusst [234]. Wie in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, steigerten sich CTL-Aktivität und CTL-Frequenzen [237,238]. Die Aktivierung des GITR-Signalweges in einer frühen Phase der T-Zellaktivierung gewährleistet das Überleben von T-Zellen [239], sowie eine gewisse Resistenz gegenüber der Wirkung von Treg. Damit stellt dies eine interessante Option dar, um eine Vakzine-aktivierte Immunantwort zu verbessern [240].

#### **4.5.2 Rekombinantes Protein zur Aktivierung des GITR-Signalwegs**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das mtGITRL-Protein hergestellt, das durch die Bindung an GITR auf die gleiche Weise wie der DTA-1 den GITR-Signalweg im reinen Mausmodell aktiviert. Um diese Option auch im Menschen oder in einem humanisierten Mausmodell testen zu können wurde parallel dazu die Struktur des mtGITRL-Proteins für ein htGITRL-Protein adaptiert. In Untersuchungen zur Aktivität der rekombinanten Proteine, die mit GITR exprimierenden Zellen durchgeführt wurden, aktivierten mtGITRL-Proteine den NFκB-Signalweg ähnlich stark wie DTA-1. Untersuchungen zur Aktivität der htGITRL-Proteine waren wegen des Fehlens einer stabil hGITR exprimierenden Zelllinie nicht möglich. Die rekombinante Hochexpression des GITR in

humanen Zelllinien wurde so stark herabreguliert und konnte durchflusszytometrisch nur bis maximal 24 h nach Transfektion nachgewiesen werden.

In weiterführenden Studien sollen die rekombinanten mtGITRL-Proteine in Kombination mit Ad-p14 im Mausmodell getestet, der Einfluss auf CTL und das Wachstum HPV<sup>+</sup> Tumore beurteilt werden. Darüber hinaus soll die Wirkung der htGITRL-Proteine in *in-vitro*-Stimulationsversuchen oder aber im humanisierten Mausmodell analysiert werden. Mit der Bereitstellung beider Proteine und dem Xenotransplantationsmodell mit humanen HPV<sup>+</sup> Tumoren schafft die hier vorgelegte Arbeit die Voraussetzungen für weitere Untersuchungen zur Optimierung der Wirkung einer Tumorstimmung.

#### **4.6 Konsequenzen und Perspektiven in der Immuntherapie von HPV-assoziierten Tumorerkrankungen**

In dieser Arbeit wurden Mechanismen zur Stimulation einer Tumor-spezifischen CTL-Antwort vorgestellt. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der immunologische Verlauf einer HPV-induzierten Tumorerkrankung mit dem einer chronischen Virusinfektion, bzw. deren Fortschreiten vergleichbar ist. Sie verdeutlichen, dass sich im Verlauf die Aktivität von reaktiven T-Zellen im Sinne einer CTL-Funktion einschließlich der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine immer mehr erschöpft und sich aber gleichzeitig regulatorische Mechanismen, wie die Wirkung von FoxP3<sup>+</sup> Treg und die Anreicherung anti-inflammatorischer Zytokine verstärken. Für eine Tumorstherapie ist somit nicht nur allein die Aktivierung einer effektiven T-Zellantwort, sondern auch die Kontrolle der immunregulatorischen Mechanismen erforderlich. Die Erforschung beider Aspekte steht derzeit im Zentrum der Immuntherapie von Tumoren.

Neueste Untersuchungen beschreiben eine Vielzahl an inhibitorischen Rezeptoren, wie den *Programmed Death 1 Receptor*, das *Lymphocyte Activation Gene-3*, das *T-Cell Immunoglobulin Mucin-3* oder CTLA-4 auf erschöpften T—Zellen [241,242]. Immunsuppressive Zellen, wie Tumor-assoziierte Makrophagen, *Myeloid-Derived Suppressive Cells*, Th17-Zellen und FoxP3<sup>+</sup> Treg werden sowohl in chronischen Erkrankungen als auch in Tumorgewebe dokumentiert [243,244]. Andere Untersuchungen konzentrieren sich auf die Verbesserung der T-Zellaktivität, wie beispielsweise durch Aktivierung bestimmter Signalwege, wie der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie oder der von Wnt/β-Catenin [245,246]. Eine weitere Option bietet der adoptive Transfer spezifischer T—Zellen, die *in vitro* entweder durch Aktivierung oder

durch TCR-Transfer hergestellt werden [247,248]. Inwieweit diese verschiedenen Möglichkeiten in einer Tumorthherapie angewendet werden können und diese verbessern, bleibt zu untersuchen. In jedem Fall dienen sie dem Erkenntnisgewinn in der Tumorbiologie. Somit sind für die Entwicklung geeigneter Tumorstoffe und zur Verbesserung der derzeitigen Immuntherapie von Tumoren weitere Untersuchungen notwendig, die sowohl die Eigenschaften der Tumorgewebe, als auch den Immunstatus, insbesondere den Prozess der T-Zellerschöpfung ausführlicher bestimmen.

## Literaturverzeichnis

- [1] zur Hausen, H. (1987): Papillomaviruses in human cancer, Appl Pathol (vol. 5), No. 1, pp. 19-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3040050](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3040050)
- [2] **Cancer, International Agency for Research on (2008): Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 Summary, Globocan Cancer Fact Sheet, Globocan 2008**
- [3] Paaavonen, J. (2007): Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias, Int J Infect Dis (vol. 11 Suppl 2), pp. S3-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18162244](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18162244)
- [4] Psyrri, A. and DiMaio, D. (2008): Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer, Nat Clin Pract Oncol (vol. 5), No. 1, pp. 24-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18097454](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18097454)
- [5] de Villiers, E. M.; Fauquet, C.; Broker, T. R.; Bernard, H. U. and zur Hausen, H. (2004): Classification of papillomaviruses, Virology (vol. 324), No. 1, pp. 17-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15183049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15183049)
- [6] zur Hausen, H. (2009): Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account, Virology (vol. 384), No. 2, pp. 260-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19135222](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19135222)
- [7] Knudson, A. G., Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, Proc Natl Acad Sci U S A (vol. 68), No. 4, pp. 820-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5279523](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5279523)
- [8] Knudson, A. G. (1996): Hereditary cancer: two hits revisited, J Cancer Res Clin Oncol (vol. 122), No. 3, pp. 135-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8601560](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8601560)
- [9] Lowe, S. W.; Cepero, E. and Evan, G. (2004): Intrinsic tumour suppression, Nature (vol. 432), No. 7015, pp. 307-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15549092](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15549092)
- [10] Sherr, C. J. (2004): Principles of tumor suppression, Cell (vol. 116), No. 2, pp. 235-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14744434](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744434)
- [11] Smyth, M. J.; Dunn, G. P. and Schreiber, R. D. (2006): Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity, Adv Immunol (vol. 90), pp. 1-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16730260](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16730260)

- [12] Galluzzi, L.; Morselli, E.; Kepp, O.; Vitale, I.; Rigoni, A.; Vacchelli, E.; Michaud, M.; Zischka, H.; Castedo, M. and Kroemer, G. (2010): Mitochondrial gateways to cancer, *Mol Aspects Med* (vol. 31), No. 1, pp. 1-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19698742](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19698742)
- [13] Dow, L. E. and Humbert, P. O. (2007): Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis, *Int Rev Cytol* (vol. 262), pp. 253-302. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17631191](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17631191)
- [14] Marastoni, S.; Ligresti, G.; Lorenzon, E.; Colombatti, A. and Mongiat, M. (2008): Extracellular matrix: a matter of life and death, *Connect Tissue Res* (vol. 49), No. 3, pp. 203-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18661343](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18661343)
- [15] Wang, S. and El-Deiry, W. S. (2003): TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors, *Oncogene* (vol. 22), No. 53, pp. 8628-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14634624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14634624)
- [16] zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer* (vol. 2), No. 5, pp. 342-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12044010](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12044010)
- [17] Moody, C. A. and Laimins, L. A. (2010): Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nat Rev Cancer* (vol. 10), No. 8, pp. 550-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20592731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20592731)
- [18] Lehoux, M.; D'Abramo, C. M. and Archambault, J. (2009): Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis, *Public Health Genomics* (vol. 12), No. 5-6, pp. 268-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19684440](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19684440)
- [19] Zhang, B.; Li, P.; Wang, E.; Brahmi, Z.; Dunn, K. W.; Blum, J. S. and Roman, A. (2003): The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma, *Virology* (vol. 310), No. 1, pp. 100-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12788634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12788634)
- [20] Ashrafi, G. H.; Tsirimonaki, E.; Marchetti, B.; O'Brien, P. M.; Sibbet, G. J.; Andrew, L. and Campo, M. S. (2002): Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins, *Oncogene* (vol. 21), No. 2, pp. 248-59. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11803468](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11803468)
- [21] Coley, W. B. (1910): The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*), *Proc R Soc Med* (vol. 3), No. Surg Sect, pp. 1-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19974799](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19974799)

- [22] Ehrlich, P. (1909): Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung, Ned. Tijdschr. Genees. (vol. 5), pp. 273-290.
- [23] Medawar, P. B. (1944): The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council, J Anat (vol. 78), No. Pt 5, pp. 176-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17104960](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17104960)
- [24] Klein, G. (1966): Tumor antigens, Annu Rev Microbiol (vol. 20), pp. 223-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5330233](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5330233)
- [25] Old, L. J. and Boyse, E. A. (1964): Immunology of Experimental Tumors, Annu Rev Med (vol. 15), pp. 167-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14139934](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14139934)
- [26] Burnet, F. M. (1970): The concept of immunological surveillance, Prog Exp Tumor Res (vol. 13), pp. 1-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4921480](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4921480)
- [27] Burnet, M. (1964): Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis, Br Med Bull (vol. 20), pp. 154-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14168097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14168097)
- [28] Thomas, L. (1982): On immunosurveillance in human cancer, Yale J Biol Med (vol. 55), No. 3-4, pp. 329-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6758376](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6758376)
- [29] Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape, Nat Immunol (vol. 3), No. 11, pp. 991-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12407406](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12407406)
- [30] Smyth, M. J.; Godfrey, D. I. and Trapani, J. A. (2001): A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy, Nat Immunol (vol. 2), No. 4, pp. 293-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11276199](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11276199)
- [31] Shankaran, V.; Ikeda, H.; Bruce, A. T.; White, J. M.; Swanson, P. E.; Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2001): IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, Nature (vol. 410), No. 6832, pp. 1107-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11323675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11323675)
- [32] Whiteside, T. L. (2008): The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth, Oncogene (vol. 27), No. 45, pp. 5904-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18836471](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18836471)
- [33] Matzinger, P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family, Annu Rev Immunol (vol. 12), pp. 991-1045. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8011301](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8011301)
- [34] Pardoll, D. (2003): Does the immune system see tumors as foreign or self?, *Annu Rev Immunol* (vol. 21), pp. 807-39. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12615893](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615893)
- [35] Willimsky, G. and Blankenstein, T. (2005): Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance, *Nature* (vol. 437), No. 7055, pp. 141-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16136144](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16136144)
- [36] Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. (2002): Rules for making human tumor cells, *N Engl J Med* (vol. 347), No. 20, pp. 1593-603. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12432047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432047)
- [37] Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. (2002): Modelling the molecular circuitry of cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 2), No. 5, pp. 331-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12044009](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12044009)
- [38] Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004): Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med* (vol. 10), No. 8, pp. 789-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15286780](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286780)
- [39] Whiteside, T. L. (2006): The role of immune cells in the tumor microenvironment, *Cancer Treat Res* (vol. 130), pp. 103-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16610705](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16610705)
- [40] Irving, B. A. and Weiss, A. (1991): The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways, *Cell* (vol. 64), No. 5, pp. 891-901. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1705867](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1705867)
- [41] Greenwald, R. J.; Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. (2005): The B7 family revisited, *Annu Rev Immunol* (vol. 23), pp. 515-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15771580](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771580)
- [42] Kalinski, P.; Hilkens, C. M.; Wierenga, E. A. and Kapsenberg, M. L. (1999): T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal, *Immunol Today* (vol. 20), No. 12, pp. 561-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10562707](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10562707)
- [43] Fearon, D. T. and Locksley, R. M. (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response, *Science* (vol. 272), No. 5258, pp. 50-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8600536](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8600536)
- [44] Sahin, U.; Tureci, O. and Pfreundschuh, M. (1997): Serological identification of human tumor antigens, *Curr Opin Immunol* (vol. 9), No. 5, pp. 709-16. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9368781](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9368781)
- [45] Provinciali, M. (2009): Immunosenescence and cancer vaccines, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 58), No. 12, pp. 1959-67. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19198836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19198836)
- [46] Schwartz-Albiez, R.; Monteiro, R. C.; Rodriguez, M.; Binder, C. J. and Shoenfeld, Y. (2009): Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation, *Clin Exp Immunol* (vol. 158 Suppl 1), pp. 43-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19883423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19883423)
- [47] Palena, C. and Schlom, J. (2010): Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses, *J Biomed Biotechnol* (vol. 2010), p. 380697. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20300434](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20300434)
- [48] Chang, C. C. and Ferrone, S. (2007): Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 56), No. 2, pp. 227-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16783578](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16783578)
- [49] Gajewski, T. F.; Meng, Y. and Harlin, H. (2006): Immune suppression in the tumor microenvironment, *J Immunother* (vol. 29), No. 3, pp. 233-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16699366](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16699366)
- [50] Seliger, B. (2005): Strategies of tumor immune evasion, *BioDrugs* (vol. 19), No. 6, pp. 347-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16392887](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16392887)
- [51] Tomasi, T. B.; Magner, W. J. and Khan, A. N. (2006): Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 55), No. 10, pp. 1159-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16680460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16680460)
- [52] Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002): Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack, *J Leukoc Biol* (vol. 71), No. 6, pp. 907-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12050175](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12050175)
- [53] Bolpetti, A.; Silva, J. S.; Villa, L. L. and Lepique, A. P. (2010): Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth, *BMC Immunol* (vol. 11), p. 27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20525400](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20525400)
- [54] Bermudez-Morales, V. H.; Gutierrez, L. X.; Alcocer-Gonzalez, J. M.; Burguete, A. and Madrid-Marina, V. (2008): Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape,

- Cancer Invest (vol. 26), No. 10, pp. 1037-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18798072](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18798072)
- [55] Vermeulen, C. F.; Jordanova, E. S.; Zomerdijsk-Nooijen, Y. A.; ter Haar, N. T.; Peters, A. A. and Fleuren, G. J. (2005): Frequent HLA class I loss is an early event in cervical carcinogenesis, *Hum Immunol* (vol. 66), No. 11, pp. 1167-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16571417](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16571417)
- [56] Visser, J.; Nijman, H. W.; Hoogenboom, B. N.; Jager, P.; van Baarle, D.; Schuurin, E.; Abdulahad, W.; Miedema, F.; van der Zee, A. G. and Daemen, T. (2007): Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia, *Clin Exp Immunol* (vol. 150), No. 2, pp. 199-209. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17937675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17937675)
- [57] Kanodia, S.; Fahey, L. M. and Kast, W. M. (2007): Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response, *Curr Cancer Drug Targets* (vol. 7), No. 1, pp. 79-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17305480](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17305480)
- [58] Fausch, S. C.; Da Silva, D. M.; Rudolf, M. P. and Kast, W. M. (2002): Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses, *J Immunol* (vol. 169), No. 6, pp. 3242-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12218143](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12218143)
- [59] Evans, M.; Borysiewicz, L. K.; Evans, A. S.; Rowe, M.; Jones, M.; Gileadi, U.; Cerundolo, V. and Man, S. (2001): Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6, *J Immunol* (vol. 167), No. 9, pp. 5420-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11673561](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11673561)
- [60] Stanley, M. (2006): Immune responses to human papillomavirus, *Vaccine* (vol. 24 Suppl 1), pp. S16-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16219398](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16219398)
- [61] Baseman, J. G. and Koutsky, L. A. (2005): The epidemiology of human papillomavirus infections, *J Clin Virol* (vol. 32 Suppl 1), pp. S16-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15753008](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15753008)
- [62] Konya, J. and Dillner, J. (2001): Immunity to oncogenic human papillomaviruses, *Adv Cancer Res* (vol. 82), pp. 205-38. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11447764](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11447764)
- [63] van der Burg, S. H.; Rensing, M. E.; Kwappenberg, K. M.; de Jong, A.; Straathof, K.; de Jong, J.; Geluk, A.; van Meijgaarden, K. E.; Franken, K. L.; Ottenhoff, T. H.; Fleuren, G. J.; Kenter, G.; Melief, C. J. and Offringa, R. (2001): Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of

- 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes, *Int J Cancer* (vol. 91), No. 5, pp. 612-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11267969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11267969)
- [64] Sheu, B. C.; Lin, R. H.; Lien, H. C.; Ho, H. N.; Hsu, S. M. and Huang, S. C. (2001): Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer, *J Immunol* (vol. 167), No. 5, pp. 2972-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11509647](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11509647)
- [65] Heim, K.; Widschwendter, A.; Szedenik, H.; Geier, A.; Christensen, N. D.; Bergant, A.; Concin, N. and Hopfl, R. (2005): Specific serologic response to genital human papillomavirus types in patients with vulvar precancerous and cancerous lesions, *Am J Obstet Gynecol* (vol. 192), No. 4, pp. 1073-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15846183](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15846183)
- [66] Arreygue-Garcia, N. A.; Daneri-Navarro, A.; del Toro-Arreola, A.; Cid-Arregui, A.; Gonzalez-Ramella, O.; Jave-Suarez, L. F.; Aguilar-Lemarroy, A.; Troyo-Sanroman, R.; Bravo-Cuellar, A.; Delgado-Rizo, V.; Garcia-Iglesias, T.; Hernandez-Flores, G. and Del Toro-Arreola, S. (2008): Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions, *BMC Cancer* (vol. 8), p. 16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18208618](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18208618)
- [67] Textor, S.; Durst, M.; Jansen, L.; Accardi, R.; Tommasino, M.; Trunk, M. J.; Porgador, A.; Watzl, C.; Gissmann, L. and Cerwenka, A. (2008): Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer, *Int J Cancer* (vol. 123), No. 10, pp. 2343-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18712710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18712710)
- [68] Liu, D. W.; Yang, Y. C.; Lin, H. F.; Lin, M. F.; Cheng, Y. W.; Chu, C. C.; Tsao, Y. P. and Chen, S. L. (2007): Cytotoxic T-lymphocyte responses to human papillomavirus type 16 E5 and E7 proteins and HLA-A\*0201-restricted T-cell peptides in cervical cancer patients, *J Virol* (vol. 81), No. 6, pp. 2869-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17202211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17202211)
- [69] Santin, A. D.; Bellone, S.; Palmieri, M.; Bossini, B.; Roman, J. J.; Cannon, M. J.; Bignotti, E.; Cane, S. and Pecorelli, S. (2003): Induction of tumor-specific cytotoxicity in tumor infiltrating lymphocytes by HPV16 and HPV18 E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with cancer of the uterine cervix, *Gynecol Oncol* (vol. 89), No. 2, pp. 271-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12713991](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12713991)
- [70] Nakamura, T.; Shima, T.; Saeki, A.; Hidaka, T.; Nakashima, A.; Takikawa, O. and Saito, S. (2007): Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer, *Cancer Sci* (vol. 98), No. 6, pp. 874-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17433037](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17433037)

- [71] Kobayashi, A.; Weinberg, V.; Darragh, T. and Smith-McCune, K. (2008): Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis, *Mucosal Immunol* (vol. 1), No. 5, pp. 412-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19079205](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19079205)
- [72] Bhairavabhotla, R. K.; Verm, V.; Tongaonkar, H.; Shastri, S.; Dinshaw, K. and Chiplunkar, S. (2007): Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer, *Indian J Biochem Biophys* (vol. 44), No. 5, pp. 350-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18341210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18341210)
- [73] Goncharuk, I. V.; Vorobjova, L. I.; Lukyanova, N. Y. and Chekhun, V. F. (2009): Vascular endothelial growth factor expression in uterine cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics and survival, *Exp Oncol* (vol. 31), No. 3, pp. 179-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19783962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19783962)
- [74] Herfs, M.; Herman, L.; Hubert, P.; Minner, F.; Arafa, M.; Roncarati, P.; Henrotin, Y.; Boniver, J. and Delvenne, P. (2009): High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 58), No. 4, pp. 603-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18802697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18802697)
- [75] Diaz-Benitez, C. E.; Navarro-Fuentes, K. R.; Flores-Sosa, J. A.; Juarez-Diaz, J.; Uribe-Salas, F. J.; Roman-Basaure, E.; Gonzalez-Mena, L. E.; Alonso de Ruiz, P.; Lopez-Estrada, G.; Lagunas-Martinez, A.; Bermudez-Morales, V. H.; Alcocer-Gonzalez, J. M.; Martinez-Barnette, J.; Hernandez-Pando, R.; Rosenstein, Y.; Moreno, J. and Madrid-Marina, V. (2009): CD3zeta expression and T cell proliferation are inhibited by TGF-beta1 and IL-10 in cervical cancer patients, *J Clin Immunol* (vol. 29), No. 4, pp. 532-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19259799](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19259799)
- [76] Alcocer-Gonzalez, J. M.; Berumen, J.; Tamez-Guerra, R.; Bermudez-Morales, V.; Peralta-Zaragoza, O.; Hernandez-Pando, R.; Moreno, J.; Gariglio, P. and Madrid-Marina, V. (2006): In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells, *Viral Immunol* (vol. 19), No. 3, pp. 481-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16987066](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16987066)
- [77] Sheu, B. C.; Chang, W. C.; Lin, H. H.; Chow, S. N. and Huang, S. C. (2007): Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia, *J Obstet Gynaecol Res* (vol. 33), No. 2, pp. 103-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17441881](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17441881)
- [78] Schreiber, T. H.; Raez, L.; Rosenblatt, J. D. and Podack, E. R. (2010): Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art, *Semin Immunol* (vol. 22), No. 3, pp. 105-12. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20226686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20226686)
- [79] Block, S. L.; Nolan, T.; Sattler, C.; Barr, E.; Giacoletti, K. E.; Marchant, C. D.; Castellsague, X.; Rusche, S. A.; Lukac, S.; Bryan, J. T.; Cavanaugh, P. F., Jr. and Reisinger, K. S. (2006): Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women, *Pediatrics* (vol. 118), No. 5, pp. 2135-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17079588](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17079588)
- [80] Paavonen, J.; Jenkins, D.; Bosch, F. X.; Naud, P.; Salmeron, J.; Wheeler, C. M.; Chow, S. N.; Apter, D. L.; Kitchener, H. C.; Castellsague, X.; de Carvalho, N. S.; Skinner, S. R.; Harper, D. M.; Hedrick, J. A.; Jaisamram, U.; Limson, G. A.; Dionne, M.; Quint, W.; Spiessens, B.; Peeters, P.; Struyf, F.; Wieting, S. L.; Lehtinen, M. O. and Dubin, G. (2007): Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial, *Lancet* (vol. 369), No. 9580, pp. 2161-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17602732](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17602732)
- [81] Su, J. H.; Wu, A.; Scotney, E.; Ma, B.; Monie, A.; Hung, C. F. and Wu, T. C. (2010): Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential, *BioDrugs* (vol. 24), No. 2, pp. 109-29. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20199126](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20199126)
- [82] Uchi, H.; Stan, R.; Turk, M. J.; Engelhorn, M. E.; Rizzuto, G. A.; Goldberg, S. M.; Wolchok, J. D. and Houghton, A. N. (2006): Unraveling the complex relationship between cancer immunity and autoimmunity: lessons from melanoma and vitiligo, *Adv Immunol* (vol. 90), pp. 215-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16730265](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16730265)
- [83] Ohlschlager, P.; Pes, M.; Osen, W.; Durst, M.; Schneider, A.; Gissmann, L. and Kaufmann, A. M. (2006): An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response, *Vaccine* (vol. 24), No. 15, pp. 2880-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16472545](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16472545)
- [84] Kaufmann, A. M.; Stern, P. L.; Rankin, E. M.; Sommer, H.; Nuessler, V.; Schneider, A.; Adams, M.; Onon, T. S.; Bauknecht, T.; Wagner, U.; Kroon, K.; Hickling, J.; Boswell, C. M.; Stacey, S. N.; Kitchener, H. C.; Gillard, J.; Wanders, J.; Roberts, J. S. and Zwierzina, H. (2002): Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer, *Clin Cancer Res* (vol. 8), No. 12, pp. 3676-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12473576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12473576)
- [85] Hoffmann, C.; Stanke, J.; Kaufmann, A. M.; Loddenkemper, C.; Schneider, A. and Cichon, G. (2010): Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing

- tumors in mice, *J Immunother* (vol. 33), No. 2, pp. 136-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20145549](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20145549)
- [86] Muderspach, L.; Wilczynski, S.; Roman, L.; Bade, L.; Felix, J.; Small, L. A.; Kast, W. M.; Fascio, G.; Marty, V. and Weber, J. (2000): A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive, *Clin Cancer Res* (vol. 6), No. 9, pp. 3406-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10999722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10999722)
- [87] de Jong, A.; O'Neill, T.; Khan, A. Y.; Kwappenberg, K. M.; Chisholm, S. E.; Whittle, N. R.; Dobson, J. A.; Jack, L. C.; St Clair Roberts, J. A.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. and Hickling, J. K. (2002): Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine, *Vaccine* (vol. 20), No. 29-30, pp. 3456-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12297390](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12297390)
- [88] Frazer, I. H.; Quinn, M.; Nicklin, J. L.; Tan, J.; Perrin, L. C.; Ng, P.; O'Connor, V. M.; White, O.; Wendt, N.; Martin, J.; Crowley, J. M.; Edwards, S. J.; McKenzie, A. W.; Mitchell, S. V.; Maher, D. W.; Pearse, M. J. and Bassler, R. L. (2004): Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia, *Vaccine* (vol. 23), No. 2, pp. 172-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15531034](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15531034)
- [89] Hallez, S.; Simon, P.; Maudoux, F.; Doyen, J.; Noel, J. C.; Beliard, A.; Capelle, X.; Buxant, F.; Fayt, I.; Lagrost, A. C.; Hubert, P.; Gerday, C.; Burny, A.; Boniver, J.; Foidart, J. M.; Delvenne, P. and Jacobs, N. (2004): Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 53), No. 7, pp. 642-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14985860](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14985860)
- [90] Kaufmann, A. M.; Nieland, J. D.; Jochmus, I.; Baur, S.; Friese, K.; Gabelsberger, J.; Giesecking, F.; Gissmann, L.; Glasschroder, B.; Grubert, T.; Hillemanns, P.; Hopfl, R.; Ikenberg, H.; Schwarz, J.; Karrasch, M.; Knoll, A.; Kuppers, V.; Lechmann, M.; Lelle, R. J.; Meissner, H.; Muller, R. T.; Pawlita, M.; Petry, K. U.; Pilch, H.; Walek, E. and Schneider, A. (2007): Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3), *Int J Cancer* (vol. 121), No. 12, pp. 2794-800. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17721997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17721997)
- [91] Garcia-Hernandez, E.; Gonzalez-Sanchez, J. L.; Andrade-Manzano, A.; Contreras, M. L.; Padilla, S.; Guzman, C. C.; Jimenez, R.; Reyes, L.; Morosoli, G.; Verde, M. L. and Rosales, R. (2006): Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine, *Cancer Gene Ther* (vol. 13), No. 6, pp. 592-7. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16456551](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16456551)
- [92] Fiander, A. N.; Tristram, A. J.; Davidson, E. J.; Tomlinson, A. E.; Man, S.; Baldwin, P. J.; Sterling, J. C. and Kitchener, H. C. (2006): Prime-boost vaccination strategy in women with high-grade, noncervical anogenital intraepithelial neoplasia: clinical results from a multicenter phase II trial, *Int J Gynecol Cancer* (vol. 16), No. 3, pp. 1075-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16803488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16803488)
- [93] Lin, C. T.; Hung, C. F.; Juang, J.; He, L.; Lin, K. Y.; Kim, T. W. and Wu, T. C. (2003): Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-Specific T cell precursor frequencies and antitumor effects of HPV-16 E7-expressing Sindbis virus replicon particles, *Mol Ther* (vol. 8), No. 4, pp. 559-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14529828](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14529828)
- [94] Ferrara, A.; Nonn, M.; Sehr, P.; Schreckenberger, C.; Pawlita, M.; Durst, M.; Schneider, A. and Kaufmann, A. M. (2003): Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients, *J Cancer Res Clin Oncol* (vol. 129), No. 9, pp. 521-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12898233](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12898233)
- [95] Scholten, K. B.; Schreurs, M. W.; Ruizendaal, J. J.; Kueter, E. W.; Kramer, D.; Veenbergen, S.; Meijer, C. J. and Hooijberg, E. (2005): Preservation and redirection of HPV16E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer, *Clin Immunol* (vol. 114), No. 2, pp. 119-29. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15639645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15639645)
- [96] Youde, S. J.; McCarthy, C. M.; Thomas, K. J.; Smith, K. L. and Man, S. (2005): Cross-typic specificity and immunotherapeutic potential of a human HPV16 E7-specific CTL line, *Int J Cancer* (vol. 114), No. 4, pp. 606-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15609329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15609329)
- [97] de Jong, A.; van der Hulst, J. M.; Kenter, G. G.; Drijfhout, J. W.; Franken, K. L.; Vermeij, P.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. and Melief, C. J. (2005): Rapid enrichment of human papillomavirus (HPV)-specific polyclonal T cell populations for adoptive immunotherapy of cervical cancer, *Int J Cancer* (vol. 114), No. 2, pp. 274-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15540211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15540211)
- [98] Durrant, L. G.; Pudney, V.; Spendlove, I. and Metheringham, R. L. (2010): Vaccines as early therapeutic interventions for cancer therapy: neutralising the immunosuppressive tumour environment and increasing T cell avidity may lead to improved responses, *Expert Opin Biol Ther* (vol. 10), No. 5, pp. 735-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20384522](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20384522)
- [99] Terlouw, A.; Seters, M.; Kleinjan, A.; Heijmans-Antonissen, C.; Santegoets, L. A.; Beckmann, I.; Beurden, M.; Helmerhorst, T. J. and Blok, L. J. (2010): Imiquimod-induced clearance of HPV is associated with normalization of immune cell counts



- in usual type vulvar intraepithelial neoplasia, *Int J Cancer* (vol. 127), No. 12, pp. 2831-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21351262](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21351262)
- [100] Chuang, C. M.; Monie, A.; Hung, C. F. and Wu, T. C. (2010): Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination, *J Biomed Sci* (vol. 17), p. 32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20426849](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20426849)
- [101] Kass, E.; Panicali, D. L.; Mazzara, G.; Schlom, J. and Greiner, J. W. (2001): Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor produced by recombinant avian poxviruses enriches the regional lymph nodes with antigen-presenting cells and acts as an immunoadjuvant, *Cancer Res* (vol. 61), No. 1, pp. 206-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11196163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11196163)
- [102] Kass, E.; Parker, J.; Schlom, J. and Greiner, J. W. (2000): Comparative studies of the effects of recombinant GM-CSF and GM-CSF administered via a poxvirus to enhance the concentration of antigen- presenting cells in regional lymph nodes, *Cytokine* (vol. 12), No. 7, pp. 960-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10880241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10880241)
- [103] Smith, F. O.; Downey, S. G.; Klapper, J. A.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; Royal, R. E.; Kammula, U. S.; Hughes, M. S.; Restifo, N. P.; Levy, C. L.; White, D. E.; Steinberg, S. M. and Rosenberg, S. A. (2008): Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines, *Clin Cancer Res* (vol. 14), No. 17, pp. 5610-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18765555](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18765555)
- [104] Heemskerk, B.; Liu, K.; Dudley, M. E.; Johnson, L. A.; Kaiser, A.; Downey, S.; Zheng, Z.; Shelton, T. E.; Matsuda, K.; Robbins, P. F.; Morgan, R. A. and Rosenberg, S. A. (2008): Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2, *Hum Gene Ther* (vol. 19), No. 5, pp. 496-510. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18444786](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18444786)
- [105] Waldmann, T. A. (2006): The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design, *Nat Rev Immunol* (vol. 6), No. 8, pp. 595-601. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16868550](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16868550)
- [106] Sato, N.; Patel, H. J.; Waldmann, T. A. and Tagaya, Y. (2007): The IL-15/IL-15R $\alpha$  on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 104), No. 2, pp. 588-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17202253](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17202253)
- [107] Colombo, M. P. and Trinchieri, G. (2002): Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy, *Cytokine Growth Factor Rev* (vol. 13), No. 2, pp. 155-68.

- URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11900991](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11900991)
- [108] Zaharoff, D. A.; Hoffman, B. S.; Hooper, H. B.; Benjamin, C. J., Jr.; Khurana, K. K.; Hance, K. W.; Rogers, C. J.; Pinto, P. A.; Schlom, J. and Greiner, J. W. (2009): Intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer with chitosan/interleukin-12, *Cancer Res* (vol. 69), No. 15, pp. 6192-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19638573](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19638573)
- [109] Bracci, L.; Schumacher, R.; Provenzano, M.; Adamina, M.; Rosenthal, R.; Groeper, C.; Zajac, P.; Iezzi, G.; Proietti, E.; Belardelli, F. and Spagnoli, G. C. (2008): Efficient stimulation of T cell responses by human IFN-alpha-induced dendritic cells does not require Toll-like receptor triggering, *J Immunother* (vol. 31), No. 5, pp. 466-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18463538](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18463538)
- [110] Bracci, L.; La Sorsa, V.; Belardelli, F. and Proietti, E. (2008): Type I interferons as vaccine adjuvants against infectious diseases and cancer, *Expert Rev Vaccines* (vol. 7), No. 3, pp. 373-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18393607](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18393607)
- [111] Blobel, G. C.; Schiemann, W. P. and Lodish, H. F. (2000): Role of transforming growth factor beta in human disease, *N Engl J Med* (vol. 342), No. 18, pp. 1350-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10793168](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10793168)
- [112] Teicher, B. A. (2001): Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta, *Cancer Metastasis Rev* (vol. 20), No. 1-2, pp. 133-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11831642](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11831642)
- [113] di Bari, M. G.; Lutsiak, M. E.; Takai, S.; Mostbock, S.; Farsaci, B.; Semnani, R. T.; Wakefield, L. M.; Schlom, J. and Sabzevari, H. (2009): TGF-beta modulates the functionality of tumor-infiltrating CD8+ T cells through effects on TCR signaling and Spred1 expression, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 58), No. 11, pp. 1809-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19319531](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19319531)
- [114] Terabe, M.; Ambrosino, E.; Takaku, S.; O'Konek, J. J.; Venzon, D.; Lonning, S.; McPherson, J. M. and Berzofsky, J. A. (2009): Synergistic enhancement of CD8+ T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody, *Clin Cancer Res* (vol. 15), No. 21, pp. 6560-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19861451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19861451)
- [115] Harding, F. A.; McArthur, J. G.; Gross, J. A.; Raulet, D. H. and Allison, J. P. (1992): CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones, *Nature* (vol. 356), No. 6370, pp. 607-9. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1313950](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1313950)
- [116] Zang, X. and Allison, J. P. (2007): The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition, *Clin Cancer Res* (vol. 13), No. 18 Pt 1, pp. 5271-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17875755](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17875755)
- [117] Iwai, Y.; Ishida, M.; Tanaka, Y.; Okazaki, T.; Honjo, T. and Minato, N. (2002): Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 19, pp. 12293-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12218188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12218188)
- [118] Hirano, F.; Kaneko, K.; Tamura, H.; Dong, H.; Wang, S.; Ichikawa, M.; Rietz, C.; Flies, D. B.; Lau, J. S.; Zhu, G.; Tamada, K. and Chen, L. (2005): Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity, *Cancer Res* (vol. 65), No. 3, pp. 1089-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15705911](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15705911)
- [119] Egen, J. G.; Kuhns, M. S. and Allison, J. P. (2002): CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy, *Nat Immunol* (vol. 3), No. 7, pp. 611-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12087419](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12087419)
- [120] Egen, J. G. and Allison, J. P. (2002): Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength, *Immunity* (vol. 16), No. 1, pp. 23-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11825563](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11825563)
- [121] Ronchetti, S.; Nocentini, G.; Bianchini, R.; Krausz, L. T.; Migliorati, G. and Riccardi, C. (2007): Glucocorticoid-induced TNFR-related protein lowers the threshold of CD28 costimulation in CD8+ T cells, *J Immunol* (vol. 179), No. 9, pp. 5916-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17947665](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17947665)
- [122] Krausz, L. T.; Bianchini, R.; Ronchetti, S.; Fettucciari, K.; Nocentini, G. and Riccardi, C. (2007): GITR-GITRL system, a novel player in shock and inflammation, *ScientificWorldJournal* (vol. 7), pp. 533-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17525820](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17525820)
- [123] Nocentini, G.; Ronchetti, S.; Cuzzocrea, S. and Riccardi, C. (2007): GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system, *Eur J Immunol* (vol. 37), No. 5, pp. 1165-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17407102](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17407102)
- [124] Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y. and Sakaguchi, S. (2002): Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance, *Nat Immunol* (vol. 3), No. 2, pp. 135-42. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11812990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11812990)
- [125] Ko, K.; Yamazaki, S.; Nakamura, K.; Nishioka, T.; Hirota, K.; Yamaguchi, T.; Shimizu, J.; Nomura, T.; Chiba, T. and Sakaguchi, S. (2005): Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells, *J Exp Med* (vol. 202), No. 7, pp. 885-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16186187](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16186187)
- [126] Shimizu, J.; Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999): Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity, *J Immunol* (vol. 163), No. 10, pp. 5211-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10553041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10553041)
- [127] Onizuka, S.; Tawara, I.; Shimizu, J.; Sakaguchi, S.; Fujita, T. and Nakayama, E. (1999): Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody, *Cancer Res* (vol. 59), No. 13, pp. 3128-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10397255](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10397255)
- [128] Sakaguchi, S. (2005): Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self, *Nat Immunol* (vol. 6), No. 4, pp. 345-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15785760](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15785760)
- [129] Itoh, M.; Takahashi, T.; Sakaguchi, N.; Kuniyasu, Y.; Shimizu, J.; Otsuka, F. and Sakaguchi, S. (1999): Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance, *J Immunol* (vol. 162), No. 9, pp. 5317-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10228007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10228007)
- [130] Woo, E. Y.; Chu, C. S.; Goletz, T. J.; Schlienger, K.; Yeh, H.; Coukos, G.; Rubin, S. C.; Kaiser, L. R. and June, C. H. (2001): Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer, *Cancer Res* (vol. 61), No. 12, pp. 4766-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11406550](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11406550)
- [131] Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2005): Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity, *Curr Top Microbiol Immunol* (vol. 293), pp. 287-302. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15981485](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15981485)
- [132] Wolf, A. M.; Wolf, D.; Steurer, M.; Gastl, G.; Gunsilius, E. and Grubeck-Loebenstien, B. (2003): Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients, *Clin Cancer Res* (vol. 9), No. 2, pp. 606-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12576425](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12576425)

- [133] van der Burg, S. H.; Piersma, S. J.; de Jong, A.; van der Hulst, J. M.; Kwappenberg, K. M.; van den Henden, M.; Welters, M. J.; Van Rood, J. J.; Fleuren, G. J.; Melief, C. J.; Kenter, G. G. and Offringa, R. (2007): Association of cervical cancer with the presence of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 104), No. 29, pp. 12087-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17615234](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17615234)
- [134] Chuang, C. M.; Monie, A.; Wu, A. and Hung, C. F. (2009): Combination of apigenin treatment with therapeutic HPV DNA vaccination generates enhanced therapeutic antitumor effects, *J Biomed Sci* (vol. 16), p. 49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19473507](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19473507)
- [135] Tseng, C. W.; Trimble, C.; Zeng, Q.; Monie, A.; Alvarez, R. D.; Huh, W. K.; Hoory, T.; Wang, M. C.; Hung, C. F. and Wu, T. C. (2009): Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 58), No. 5, pp. 737-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18815785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18815785)
- [136] Leachman, S. A.; Tigelaar, R. E.; Shlyankevich, M.; Slade, M. D.; Irwin, M.; Chang, E.; Wu, T. C.; Xiao, W.; Pazhani, S.; Zelterman, D. and Brandsma, J. L. (2000): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor priming plus papillomavirus E6 DNA vaccination: effects on papilloma formation and regression in the cottontail rabbit papillomavirus--rabbit model, *J Virol* (vol. 74), No. 18, pp. 8700-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10954571](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10954571)
- [137] Kim, M. S. and Sin, J. I. (2005): Both antigen optimization and lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumour model, *Immunology* (vol. 116), No. 2, pp. 255-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16162274](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16162274)
- [138] Wlazlo, A. P.; Deng, H.; Giles-Davis, W. and Ertl, H. C. (2004): DNA vaccines against the human papillomavirus type 16 E6 or E7 oncoproteins, *Cancer Gene Ther* (vol. 11), No. 6, pp. 457-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15118761](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15118761)
- [139] Tsen, S. W.; Paik, A. H.; Hung, C. F. and Wu, T. C. (2007): Enhancing DNA vaccine potency by modifying the properties of antigen-presenting cells, *Expert Rev Vaccines* (vol. 6), No. 2, pp. 227-39. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17408372](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17408372)
- [140] Brodsky, J. L. (1996): Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal, *Trends Biochem Sci* (vol. 21), No. 4, pp. 122-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8701466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8701466)
- [141] Walker, K. B.; Keeble, J. and Colaco, C. (2007): Mycobacterial heat shock proteins as vaccines - a model of facilitated antigen presentation, *Curr Mol Med* (vol. 7),

- No. 4, pp. 339-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17584074](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17584074)
- [142] Sharma, R. K.; Elpek, K. G.; Yolcu, E. S.; Schabowsky, R. H.; Zhao, H.; Bandura-Morgan, L. and Shirwan, H. (2009): Costimulation as a platform for the development of vaccines: a peptide-based vaccine containing a novel form of 4-1BB ligand eradicates established tumors, *Cancer Res* (vol. 69), No. 10, pp. 4319-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19435920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19435920)
- [143] Chen, Y. F.; Lin, C. W.; Tsao, Y. P. and Chen, S. L. (2004): Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice, *J Virol* (vol. 78), No. 3, pp. 1333-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14722288](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14722288)
- [144] Manuri, P. R.; Nehete, B.; Nehete, P. N.; Reisenauer, R.; Wardell, S.; Courtney, A. N.; Gambhira, R.; Lomada, D.; Chopra, A. K. and Sastry, K. J. (2007): Intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16 induces systemic and mucosal cellular immune responses and tumor protection, *Vaccine* (vol. 25), No. 17, pp. 3302-10. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17291642](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17291642)
- [145] Zwaveling, S.; Ferreira Mota, S. C.; Nouta, J.; Johnson, M.; Lipford, G. B.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. and Melief, C. J. (2002): Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides, *J Immunol* (vol. 169), No. 1, pp. 350-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12077264](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077264)
- [146] Ralph, P. (1973): Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and theta + -lymphomas: sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin, *J Immunol* (vol. 110), No. 6, pp. 1470-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4541304](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4541304)
- [147] Coley, H. M.; Amos, W. B.; Twentyman, P. R. and Workman, P. (1993): Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines, *Br J Cancer* (vol. 67), No. 6, pp. 1316-23. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8099807](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8099807)
- [148] Pajtasz-Piasecka, E.; Szyda, A.; Rossowska, J.; Krawczenko, A.; Indrova, M.; Grabarczyk, P.; Wysocki, P.; Mackiewicz, A. and Dus, D. (2004): Loss of tumorigenicity of murine colon carcinoma MC38/0 cell line after transduction with a retroviral vector carrying murine IL-12 genes, *Folia Biol (Praha)* (vol. 50), No. 1, pp. 7-14. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15055737](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15055737)

- [149] Hutchinson, J. N. and Muller, W. J. (2000): Transgenic mouse models of human breast cancer, *Oncogene* (vol. 19), No. 53, pp. 6130-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11156526](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11156526)
- [150] dos Santos, N. R. and Ghysdael, J. (2006): A transgenic mouse model for TEL-JAK2-induced B-cell lymphoma/leukemia, *Leukemia* (vol. 20), No. 1, pp. 182-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16281066](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16281066)
- [151] Renard, N.; Boucreux, D.; Lemonnier, F. and Inchauspe, G. (2000): HLA-A2 transgenic mouse model: potential utility for development of an HCV vaccine, *J Hepatol* (vol. 32), No. 2, pp. 363-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10707882](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10707882)
- [152] Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S. and Brennan, M. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *J Natl Cancer Inst* (vol. 51), No. 5, pp. 1409-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4357757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4357757)
- [153] Alimirah, F.; Chen, J.; Basrawala, Z.; Xin, H. and Choubey, D. (2006): DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation, *FEBS Lett* (vol. 580), No. 9, pp. 2294-300. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16580667](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16580667)
- [154] Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T. and Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int J Cancer* (vol. 26), No. 2, pp. 171-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6970727](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6970727)
- [155] Salter, R. D.; Howell, D. N. and Cresswell, P. (1985): Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids, *Immunogenetics* (vol. 21), No. 3, pp. 235-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3872841](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3872841)
- [156] Salter, R. D. and Cresswell, P. (1986): Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid, *EMBO J* (vol. 5), No. 5, pp. 943-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3522223](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3522223)
- [157] Prochazka, M.; Gaskins, H. R.; Shultz, L. D. and Leiter, E. H. (1992): The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 89), No. 8, pp. 3290-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1373493](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1373493)
- [158] Green, M.; Rogers, D.; Russell, P.; Stagg, A. J.; Bell, D. L.; Eley, S. M.; Titball, R. W. and Williamson, E. D. (1999): The SCID/Beige mouse as a model to investigate

- protection against *Yersinia pestis*, *FEMS Immunol Med Microbiol* (vol. 23), No. 2, pp. 107-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10076907](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10076907)
- [159] Bankert, R. B.; Egilmez, N. K. and Hess, S. D. (2001): Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies, *Trends Immunol* (vol. 22), No. 7, pp. 386-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11429323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11429323)
- [160] Beckhove, P.; Schutz, F.; Diel, I. J.; Solomayer, E. F.; Bastert, G.; Foerster, J.; Feuerer, M.; Bai, L.; Sinn, H. P.; Umansky, V. and Schirmmacher, V. (2003): Efficient engraftment of human primary breast cancer transplants in nonconditioned NOD/Scid mice, *Int J Cancer* (vol. 105), No. 4, pp. 444-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12712433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12712433)
- [161] Durig, J.; Ebeling, P.; Grabellus, F.; Sorg, U. R.; Mollmann, M.; Schutt, P.; Gothert, J.; Sellmann, L.; Seeber, S.; Flasshove, M.; Duhrsen, U. and Moritz, T. (2007): A novel nonobese diabetic/severe combined immunodeficient xenograft model for chronic lymphocytic leukemia reflects important clinical characteristics of the disease, *Cancer Res* (vol. 67), No. 18, pp. 8653-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17875705](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17875705)
- [162] Hayashi, M.; Kondoh, K.; Nakata, Y.; Kinoshita, A.; Mori, T.; Takahashi, T.; Sakamoto, M. I. and Yamada, T. (2007): Establishment of a novel childhood acute myeloid leukaemia cell line, KOPM-88, containing partial tandem duplication of the MLL gene and an in vivo model for childhood acute myeloid leukaemia using NOD/SCID mice, *Br J Haematol* (vol. 137), No. 3, pp. 221-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17408461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17408461)
- [163] Kawano, N.; Ishikawa, F.; Shimoda, K.; Yasukawa, M.; Nagafuji, K.; Miyamoto, T.; Baba, E.; Tanaka, T.; Yamasaki, S.; Gondo, H.; Otsuka, T.; Ohshima, K.; Shultz, L. D.; Akashi, K. and Harada, M. (2005): Efficient engraftment of primary adult T-cell leukemia cells in newborn NOD/SCID/beta2-microglobulin(null) mice, *Leukemia* (vol. 19), No. 8, pp. 1384-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15959532](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15959532)
- [164] Dalerba, P.; Dylla, S. J.; Park, I. K.; Liu, R.; Wang, X.; Cho, R. W.; Hoey, T.; Gurney, A.; Huang, E. H.; Simeone, D. M.; Shelton, A. A.; Parmiani, G.; Castelli, C. and Clarke, M. F. (2007): Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 104), No. 24, pp. 10158-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17548814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17548814)
- [165] O'Brien, C. A.; Pollett, A.; Gallinger, S. and Dick, J. E. (2007): A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice, *Nature* (vol. 445), No. 7123, pp. 106-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17122772](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17122772)



- [166] Vasvari, G. P.; Dyckhoff, G.; Kashfi, F.; Lemke, B.; Lohr, J.; Helmke, B. M.; Schirmacher, V.; Plinkert, P. K.; Beckhove, P. and Herold-Mende, C. C. (2007): Combination of thalidomide and cisplatin in an head and neck squamous cell carcinomas model results in an enhanced antiangiogenic activity in vitro and in vivo, *Int J Cancer* (vol. 121), No. 8, pp. 1697-704. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17557286](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17557286)
- [167] Patrawala, L.; Calhoun-Davis, T.; Schneider-Broussard, R. and Tang, D. G. (2007): Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells, *Cancer Res* (vol. 67), No. 14, pp. 6796-805. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17638891](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17638891)
- [168] Zhang, A. L.; Russell, P. J.; Knittel, T. and Milross, C. (2007): Paclitaxel enhanced radiation sensitization for the suppression of human prostate cancer tumor growth via a p53 independent pathway, *Prostate* (vol. 67), No. 15, pp. 1630-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17823933](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17823933)
- [169] Chiriva-Internati, M.; Grizzi, F.; Weidanz, J. A.; Ferrari, R.; Yuefei, Y.; Velez, B.; Shearer, M. H.; Lowe, D. B.; Frezza, E. E.; Cobos, E.; Kast, W. M. and Kennedy, R. C. (2007): A NOD/SCID tumor model for human ovarian cancer that allows tracking of tumor progression through the biomarker Sp17, *J Immunol Methods* (vol. 321), No. 1-2, pp. 86-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17336323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17336323)
- [170] Lee, C. H.; Xue, H.; Sutcliffe, M.; Gout, P. W.; Huntsman, D. G.; Miller, D. M.; Gilks, C. B. and Wang, Y. Z. (2005): Establishment of subrenal capsule xenografts of primary human ovarian tumors in SCID mice: potential models, *Gynecol Oncol* (vol. 96), No. 1, pp. 48-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15589579](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15589579)
- [171] Feltkamp, M. C.; Vreugdenhil, G. R.; Vierboom, M. P.; Ras, E.; van der Burg, S. H.; ter Schegget, J.; Melief, C. J. and Kast, W. M. (1995): Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors, *Eur J Immunol* (vol. 25), No. 9, pp. 2638-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7589138](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7589138)
- [172] Lin, K. Y.; Guarnieri, F. G.; Staveley-O'Carroll, K. F.; Levitsky, H. I.; August, J. T.; Pardoll, D. M. and Wu, T. C. (1996): Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen, *Cancer Res* (vol. 56), No. 1, pp. 21-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8548765](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8548765)
- [173] Peng, S.; Trimble, C.; He, L.; Tsai, Y. C.; Lin, C. T.; Boyd, D. A.; Pardoll, D.; Hung, C. F. and Wu, T. C. (2006): Characterization of HLA-A2-restricted HPV-16 E7-specific CD8(+) T-cell immune responses induced by DNA vaccines in HLA-A2 transgenic mice, *Gene Ther* (vol. 13), No. 1, pp. 67-77. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16107858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16107858)
- [174] Eiben, G. L.; Velders, M. P.; Schreiber, H.; Cassetti, M. C.; Pullen, J. K.; Smith, L. R. and Kast, W. M. (2002): Establishment of an HLA-A\*0201 human papillomavirus type 16 tumor model to determine the efficacy of vaccination strategies in HLA-A\*0201 transgenic mice, *Cancer Res* (vol. 62), No. 20, pp. 5792-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12384540](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12384540)
- [175] Melero, I.; Singhal, M. C.; McGowan, P.; Haugen, H. S.; Blake, J.; Hellstrom, K. E.; Yang, G.; Clegg, C. H. and Chen, L. (1997): Immunological ignorance of an E7-encoded cytolytic T-lymphocyte epitope in transgenic mice expressing the E7 and E6 oncogenes of human papillomavirus type 16, *J Virol* (vol. 71), No. 5, pp. 3998-4004. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9094677](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9094677)
- [176] Arbeit, J. M.; Munger, K.; Howley, P. M. and Hanahan, D. (1994): Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice, *J Virol* (vol. 68), No. 7, pp. 4358-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7515971](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7515971)
- [177] Hu, J.; Peng, X.; Schell, T. D.; Budgeon, L. R.; Cladel, N. M. and Christensen, N. D. (2006): An HLA-A2.1-transgenic rabbit model to study immunity to papillomavirus infection, *J Immunol* (vol. 177), No. 11, pp. 8037-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17114477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17114477)
- [178] Masters, J. R. (2002): HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly, *Nat Rev Cancer* (vol. 2), No. 4, pp. 315-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12001993](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12001993)
- [179] Pattillo, R. A.; Hussa, R. O.; Story, M. T.; Ruckert, A. C.; Shalaby, M. R. and Mattingly, R. F. (1977): Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line, *Science* (vol. 196), No. 4297, pp. 1456-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=867042](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=867042)
- [180] Schmitt, M.; Bravo, I. G.; Snijders, P. J.; Gissmann, L.; Pawlita, M. and Waterboer, T. (2006): Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses, *J Clin Microbiol* (vol. 44), No. 2, pp. 504-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16455905](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16455905)
- [181] Bachran, C.; Heisler, I.; Bachran, D.; Dassler, K.; Ervens, J.; Melzig, M. F. and Fuchs, H. (2008): Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells, *Cancer Biol Ther* (vol. 7), No. 2, pp. 237-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18059188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18059188)
- [182] Fuchs, H.; Bachran, C.; Li, T.; Heisler, I.; Durkop, H. and Sutherland, M. (2007): A cleavable molecular adapter reduces side effects and concomitantly enhances

- efficacy in tumor treatment by targeted toxins in mice, *J Control Release* (vol. 117), No. 3, pp. 342-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17207883](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17207883)
- [183] Heisler, I.; Sutherland, M.; Bachran, C.; Hebestreit, P.; Schnitger, A.; Melzig, M. F. and Fuchs, H. (2005): Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells, *J Control Release* (vol. 106), No. 1-2, pp. 123-37. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15935506](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15935506)
- [184] Joseph Sambrook, David Russell (2000): *Molecular Cloning*
- [185] Mulhardt, Cornel (2007): *Molecular Biology and Genomics*.
- [186] Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* (vol. 72), pp. 248-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=942051](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=942051)
- [187] Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. (1977): A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250, *Anal Biochem* (vol. 79), No. 1-2, pp. 544-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=68686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=68686)
- [188] Elferink, B. G.; Ottenhoff, T. H. and de Vries, R. R. (1985): Epstein-Barr virus-transformed B cell lines present M. leprae antigens to T cells, *Scand J Immunol* (vol. 22), No. 5, pp. 585-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3001928](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3001928)
- [189] Fresen, K. O.; Cho, M. S. and zur Hausen, H. (1978): Heterogeneity of Epstein-Barr virus. IV. Induction of a specific antigen by EBV from two transformed marmoset cell lines in Ramos cells, *Int J Cancer* (vol. 22), No. 2, pp. 160-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=81181](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=81181)
- [190] Raudies, O.; Kuban, R. J.; Hamacher, F.; Klein-Hitpass, L.; Tchernitsa, O. I.; Sers, C.; Herzel, H. P. and Schafer, R. (2005): Functional analysis and secondary expression profiling of candidate genes deregulated in conjunction with oncogenic Ras signaling, *Adv Enzyme Regul* (vol. 45), pp. 63-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16023704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16023704)
- [191] Timonen, T. and Saksela, E. (1980): Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation, *J Immunol Methods* (vol. 36), No. 3-4, pp. 285-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7430655](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7430655)
- [192] Romani, N.; Reider, D.; Heuer, M.; Ebner, S.; Kampgen, E.; Eibl, B.; Niederwieser, D. and Schuler, G. (1996): Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability, *J Immunol Methods* (vol. 196), No. 2, pp. 137-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8841452](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8841452)

- [193] Jacobs, D. B. and Pipho, C. (1983): Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells, *J Immunol Methods* (vol. 62), No. 1, pp. 101-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6192174](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6192174)
- [194] Brunner, K. T.; Mauel, J.; Cerottini, J. C. and Chapuis, B. (1968): Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs, *Immunology* (vol. 14), No. 2, pp. 181-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4966657](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4966657)
- [195] Stanke, J.; Hoffmann, C.; Erben, U.; von Keyserling, H.; Stevanovic, S.; Cichon, G.; Schneider, A. and Kaufmann, A. M. (2010): A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function, *J Immunol Methods* (vol. 360), No. 1-2, pp. 56-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20558172](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20558172)
- [196] **Stanke J, Hoffmann C (September 2009): Module based Vector useful in the Assessment of Antigen/specific T Cell Function., European Patent Office CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN BERLIN, G01N33/50D2F2B, EP20090011876 20090917**
- [197] Boenisch, Thomas M.S. (2003): *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*, 3. ed., Dako North America, Carpinteria, CA, USA, ISBN: 3000118683.
- [198] Lee, K. H.; Wang, E.; Nielsen, M. B.; Wunderlich, J.; Migueles, S.; Connors, M.; Steinberg, S. M.; Rosenberg, S. A. and Marincola, F. M. (1999): Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression, *J Immunol* (vol. 163), No. 11, pp. 6292-300. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10570323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10570323)
- [199] Doherty, P. C.; Topham, D. J.; Tripp, R. A.; Cardin, R. D.; Brooks, J. W. and Stevenson, P. G. (1997): Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections, *Immunol Rev* (vol. 159), pp. 105-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9416506](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9416506)
- [200] Topham, D. J.; Tripp, R. A. and Doherty, P. C. (1997): CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes, *J Immunol* (vol. 159), No. 11, pp. 5197-200. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9548456](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9548456)
- [201] Walker, J. M. and Slifka, M. K. (2010): Longevity of T-cell memory following acute viral infection, *Adv Exp Med Biol* (vol. 684), pp. 96-107. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20795543](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20795543)
- [202] Kalia, V.; Sarkar, S. and Ahmed, R. (2010): CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections, *Adv Exp Med Biol* (vol. 684), pp. 79-95. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20795542](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20795542)
- [203] Kratky, W.; Reis, E. Sousa C.; Oxenius, A. and Sporri, R. (2011): Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+ T-cell priming and tumor vaccination, *Proc Natl Acad Sci U S A*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21987815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21987815)
- [204] Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (2004): On immunity against infections and vaccines: credo 2004, *Scand J Immunol* (vol. 60), No. 1-2, pp. 9-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15238068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15238068)
- [205] Stanley, M. (2010): Pathology and epidemiology of HPV infection in females, *Gynecol Oncol* (vol. 117), No. 2 Suppl, pp. S5-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20304221](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20304221)
- [206] Schreurs, M. W.; Scholten, K. B.; Kueter, E. W.; Ruizendaal, J. J.; Meijer, C. J. and Hooijberg, E. (2003): In vitro generation and life span extension of human papillomavirus type 16-specific, healthy donor-derived CTL clones, *J Immunol* (vol. 171), No. 6, pp. 2912-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12960314](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12960314)
- [207] Rensing, M. E.; Sette, A.; Brandt, R. M.; Ruppert, J.; Wentworth, P. A.; Hartman, M.; Oseroff, C.; Grey, H. M.; Melief, C. J. and Kast, W. M. (1995): Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides, *J Immunol* (vol. 154), No. 11, pp. 5934-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7538538](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7538538)
- [208] Evans, E. M.; Man, S.; Evans, A. S. and Borysiewicz, L. K. (1997): Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes, *Cancer Res* (vol. 57), No. 14, pp. 2943-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9230206](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9230206)
- [209] Limaye, A. P. and Boeckh, M. (2010): CMV in critically ill patients: pathogen or bystander?, *Rev Med Virol* (vol. 20), No. 6, pp. 372-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20931610](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20931610)
- [210] Mostowy, R.; Kouyos, R. D.; Fouchet, D. and Bonhoeffer, S. (2011): The role of recombination for the coevolutionary dynamics of HIV and the immune response, *PLoS One* (vol. 6), No. 2, p. e16052. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21364750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21364750)
- [211] Grivennikov, S. I.; Greten, F. R. and Karin, M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer, *Cell* (vol. 140), No. 6, pp. 883-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20303878](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20303878)
- [212] Willmsky, G.; Czeh, M.; Loddenkemper, C.; Gellermann, J.; Schmidt, K.; Wust, P.; Stein, H. and Blankenstein, T. (2008): Immunogenicity of premalignant lesions

- is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness, *J Exp Med* (vol. 205), No. 7, pp. 1687-700. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18573907](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18573907)
- [213] Douglas, J. L.; Gustin, J. K.; Dezube, B.; Pantanowitz, J. L. and Moses, A. V. (2007): Kaposi's sarcoma: a model of both malignancy and chronic inflammation, *Panminerva Med* (vol. 49), No. 3, pp. 119-38. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17912148](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17912148)
- [214] Hilders, C. G.; Ras, L.; van Eendenburg, J. D.; Nooyen, Y. and Fleuren, G. J. (1994): Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma, *Int J Cancer* (vol. 57), No. 6, pp. 805-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8206676](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8206676)
- [215] Kim, P. S. and Ahmed, R. (2010): Features of responding T cells in cancer and chronic infection, *Curr Opin Immunol* (vol. 22), No. 2, pp. 223-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20207527](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20207527)
- [216] Wherry, E. J.; Blattman, J. N.; Murali-Krishna, K.; van der Most, R. and Ahmed, R. (2003): Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment, *J Virol* (vol. 77), No. 8, pp. 4911-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12663797](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12663797)
- [217] Zajac, A. J.; Blattman, J. N.; Murali-Krishna, K.; Sourdive, D. J.; Suresh, M.; Altman, J. D. and Ahmed, R. (1998): Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function, *J Exp Med* (vol. 188), No. 12, pp. 2205-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9858507](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9858507)
- [218] van der Most, R. G.; Murali-Krishna, K.; Lanier, J. G.; Wherry, E. J.; Puglielli, M. T.; Blattman, J. N.; Sette, A. and Ahmed, R. (2003): Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation, *Virology* (vol. 315), No. 1, pp. 93-102. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14592762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14592762)
- [219] Brooks, D. G.; Teyton, L.; Oldstone, M. B. and McGavern, D. B. (2005): Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection, *J Virol* (vol. 79), No. 16, pp. 10514-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16051844](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16051844)
- [220] Keynan, Y.; Card, C. M.; McLaren, P. J.; Dawood, M. R.; Kasper, K. and Fowke, K. R. (2008): The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections, *Clin Infect Dis* (vol. 46), No. 7, pp. 1046-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18444822](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18444822)
- [221] Beckhove, P.; Feuerer, M.; Dolenc, M.; Schuetz, F.; Choi, C.; Sommerfeldt, N.; Schwendemann, J.; Ehlert, K.; Altevogt, P.; Bastert, G.; Schirmacher, V. and

- Umansky, V. (2004): Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors, *J Clin Invest* (vol. 114), No. 1, pp. 67-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15232613](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15232613)
- [222] Ma, Q.; Wang, C.; Jones, D.; Quintanilla, K. E.; Li, D.; Wang, Y.; Wieder, E. D.; Clise-Dwyer, K.; Alatrash, G.; Mj, Y.; Munsell, M. F.; Lu, S.; Qazilbash, M. H. and Molldrem, J. J. (2010): Adoptive transfer of PR1 cytotoxic T lymphocytes associated with reduced leukemia burden in a mouse acute myeloid leukemia xenograft model, *Cytotherapy* (vol. 12), No. 8, pp. 1056-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20735170](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20735170)
- [223] Wang, R. F. and Rosenberg, S. A. (1996): Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy, *J Leukoc Biol* (vol. 60), No. 3, pp. 296-309. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8830785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8830785)
- [224] Welters, M. J.; Kenter, G. G.; de Vos van Steenwijk, P. J.; Lowik, M. J.; Berends-van der Meer, D. M.; Essahsah, F.; Stynenbosch, L. F.; Vloon, A. P.; Ramwadhoebe, T. H.; Piersma, S. J.; van der Hulst, J. M.; Valentijn, A. R.; Fathers, L. M.; Drijfhout, J. W.; Franken, K. L.; Oostendorp, J.; Fleuren, G. J.; Melief, C. J. and van der Burg, S. H. (2010): Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 107), No. 26, pp. 11895-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20547850](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20547850)
- [225] van Driel, W. J.; Rensing, M. E.; Kenter, G. G.; Brandt, R. M.; Krul, E. J.; van Rossum, A. B.; Schuurin, E.; Offringa, R.; Bauknecht, T.; Tamm-Hermelink, A.; van Dam, P. A.; Fleuren, G. J.; Kast, W. M.; Melief, C. J. and Trimbos, J. B. (1999): Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial, *Eur J Cancer* (vol. 35), No. 6, pp. 946-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10533477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10533477)
- [226] Schreiber, H.; Wu, T. H.; Nachman, J. and Kast, W. M. (2002): Immunodominance and tumor escape, *Semin Cancer Biol* (vol. 12), No. 1, pp. 25-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11926408](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11926408)
- [227] Garrido, F.; Algarra, I. and Garcia-Lora, A. M. (2010): The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 59), No. 10, pp. 1601-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20625726](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20625726)
- [228] Urban, J. L.; Kripke, M. L. and Schreiber, H. (1986): Stepwise immunologic selection of antigenic variants during tumor growth, *J Immunol* (vol. 137), No. 9, pp. 3036-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3489784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3489784)

- [229] Virgin, H. W. (2005): Immune regulation of viral infection and vice versa, *Immunol Res* (vol. 32), No. 1-3, pp. 293-315. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16106080](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16106080)
- [230] Lacelle, M. G.; Jensen, S. M. and Fox, B. A. (2009): Partial CD4 depletion reduces regulatory T cells induced by multiple vaccinations and restores therapeutic efficacy, *Clin Cancer Res* (vol. 15), No. 22, pp. 6881-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19903784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19903784)
- [231] Shin, H. and Wherry, E. J. (2007): CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection, *Curr Opin Immunol* (vol. 19), No. 4, pp. 408-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17656078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17656078)
- [232] Toporovski, R.; Morrow, M. P. and Weiner, D. B. (2010): Interferons as potential adjuvants in prophylactic vaccines, *Expert Opin Biol Ther* (vol. 10), No. 10, pp. 1489-500. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20836750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20836750)
- [233] Yu, P.; Lee, Y.; Liu, W.; Krausz, T.; Chong, A.; Schreiber, H. and Fu, Y. X. (2005): Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors, *J Exp Med* (vol. 201), No. 5, pp. 779-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15753211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15753211)
- [234] Cohen, A. D.; Diab, A.; Perales, M. A.; Wolchok, J. D.; Rizzuto, G.; Merghoub, T.; Huggins, D.; Liu, C.; Turk, M. J.; Restifo, N. P.; Sakaguchi, S. and Houghton, A. N. (2006): Agonist anti-GITR antibody enhances vaccine-induced CD8(+) T-cell responses and tumor immunity, *Cancer Res* (vol. 66), No. 9, pp. 4904-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16651447](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16651447)
- [235] Alunno, A.; Nocentini, G.; Bistoni, O.; Bianchini, R.; Bartoloni Bocci, E.; Riccardi, C. and Gerli, R. (2010): [Glucocorticoid induced TNFR-related protein (GITR) as marker of human regulatory T cells: expansion of the GITR(+)CD25 cell subset in patients with systemic lupus erythematosus], *Reumatismo* (vol. 62), No. 3, pp. 195-201. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21052566](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21052566)
- [236] Kanamaru, F.; Youngnak, P.; Hashiguchi, M.; Nishioka, T.; Takahashi, T.; Sakaguchi, S.; Ishikawa, I. and Azuma, M. (2004): Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells, *J Immunol* (vol. 172), No. 12, pp. 7306-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15187106](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15187106)
- [237] Coe, D.; Begom, S.; Addey, C.; White, M.; Dyson, J. and Chai, J. G. (2010): Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy, *Cancer Immunol Immunother* (vol. 59), No. 9, pp. 1367-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20480365](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20480365)



- [238] Cote, A. L.; Zhang, P.; O'Sullivan, J. A.; Jacobs, V. L.; Clemis, C. R.; Sakaguchi, S.; Guevara-Patino, J. A. and Turk, M. J. (2011): Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high-avidity T cell responses to tumor-specific antigens, *J Immunol* (vol. 186), No. 1, pp. 275-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21106849](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21106849)
- [239] Esparza, E. M. and Arch, R. H. (2005): Glucocorticoid-induced TNF receptor functions as a costimulatory receptor that promotes survival in early phases of T cell activation, *J Immunol* (vol. 174), No. 12, pp. 7869-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15944292](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15944292)
- [240] Stephens, G. L.; McHugh, R. S.; Whitters, M. J.; Young, D. A.; Luxenberg, D.; Carreno, B. M.; Collins, M. and Shevach, E. M. (2004): Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells, *J Immunol* (vol. 173), No. 8, pp. 5008-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15470044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15470044)
- [241] Blackburn, S. D.; Shin, H.; Haining, W. N.; Zou, T.; Workman, C. J.; Polley, A.; Betts, M. R.; Freeman, G. J.; Vignali, D. A. and Wherry, E. J. (2009): Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection, *Nat Immunol* (vol. 10), No. 1, pp. 29-37. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19043418](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19043418)
- [242] Jin, H. T.; Anderson, A. C.; Tan, W. G.; West, E. E.; Ha, S. J.; Araki, K.; Freeman, G. J.; Kuchroo, V. K. and Ahmed, R. (2010): Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 107), No. 33, pp. 14733-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20679213](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20679213)
- [243] Ruter, J.; Barnett, B. G.; Kryczek, I.; Brumlik, M. J.; Daniel, B. J.; Coukos, G.; Zou, W. and Curiel, T. J. (2009): Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines, *Front Biosci* (vol. 14), pp. 1761-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19273160](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19273160)
- [244] Zamarron, B. F. and Chen, W. (2011): Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression, *Int J Biol Sci* (vol. 7), No. 5, pp. 651-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21647333](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21647333)
- [245] Gattinoni, L.; Ji, Y. and Restifo, N. P. (2010): Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy, *Clin Cancer Res* (vol. 16), No. 19, pp. 4695-701. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20688898](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20688898)

- [246] Watts, T. H. (2005): TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses, *Annu Rev Immunol* (vol. 23), pp. 23-68. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15771565](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771565)
- [247] Eshhar, Z. (2010): Adoptive cancer immunotherapy using genetically engineered designer T-cells: First steps into the clinic, *Curr Opin Mol Ther* (vol. 12), No. 1, pp. 55-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20140817](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20140817)
- [248] Scholten, K. B.; Ruizendaal, J. J.; Graf, M.; Schoedl, T.; Kramer, D.; Meijer, C. J.; Man, S. and Hooijberg, E. (2010): Promiscuous behavior of HPV16E6 specific T cell receptor beta chains hampers functional expression in TCR transgenic T cells, which can be restored in part by genetic modification, *Cell Oncol* (vol. 32), No. 1-2, pp. 43-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20208133](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20208133)

## Anhang

### Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Günter Cichon für die Vergabe des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung, sowie seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Uckert und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe und Unterstützung bedanken, auf die ich während meiner Arbeit immer wieder zurückgreifen konnte. Ich danke Prof. Schneider und Dr. Kaufmann für die Möglichkeit meine Experimente in den Laboren der gynäkologischen Forschungsgruppe an der Charité - Campus Benjamin Franklin durchführen zu dürfen. Für die vielen aufregenden Stunden dort und natürlich für die hilfreiche Unterstützung in fast allen Lebenslagen danke ich Ursula Kastner, Christiane Fangerau, Martina Seipel und ganz besonders Ursula Schulz.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Prof. Jens Darnedde und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe bei den Proteinexpressionsversuchen und den Luziferasetests. Mein besonderer Dank gilt dabei Sebastian Riese und Max Dörfel. Für die nette Zusammenarbeit bei der Testung des Immuntoxins SA2E im Xenotransplantationsmodell bedanke ich mich bei Dr. Christopher Bachran aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hendrik Fuchs. Ebenso möchte ich mich auch sehr bei Prof. Christoph Loddenkemper und Dr. Sefer Elezkurtaj aus der Pathologie der Charité - Campus Benjamin Franklin bedanken, denen ich einen großen Teil der (Immun)Histochemischen Analysen verdanke.

Mein ganz besonderer Dank gilt zwei Personen, die mir sehr ans Herz gewachsen sind, die ich für ihr fachliches Wissen, ihre Anteilnahme und Hilfsbereitschaft sehr schätze und mit denen ich viele Hürden nehmen und scheinbar unlösbare Aufgaben bewältigen konnte. Ich danke euch sehr, Jonas Stanke und Ulrike Erben.

Letztlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, besonders bei meiner Tante Barbara Zimmermann für ihre fachlichen Ratschläge und dafür, dass sie einmal mein Interesse für die Biologie geweckt hat. Ein ganz lieber Dank geht an meinen Bruder Sven für seinen Rückhalt und die lustigen *Zurück ins Leben* Abende. Mein größter Dank gilt meinen Eltern für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre rückhaltlose Unterstützung in allen Lebenslagen.

## Publikationsliste

Stanke J, **Hoffmann C**, Erben U, Stroh T, Cichon G, Schneider S, Kaufmann AM. Plasmid transfection fluorolysis: a sensitive method assessing MHC/HLA class I-restricted cell mediated cytotoxicity to full-length antigens. *PLoS ONE* (in revision).

von Keyserling H, Bergmann T, Schuetz M, Schiller U, Stanke J, **Hoffmann C**, Schneider A, Lehrach H, Dahl A, Kaufmann AM. 2011. Analysis of 4 single-nucleotide polymorphisms in relation to cervical dysplasia and cancer development using a high-throughput ligation-detection reaction procedure. *Int J Gynecol Cancer*. 21(9):1664-1671.

Stanke J, **Hoffmann C**, Kaufmann AM. 2011. Module based vector useful in the assessment of antigen/specific T cell function. *European Patent Office* EP2309272.

Stanke J, **Hoffmann C**, Erben U, von Keyserling H, Stevanovic S, Cichon G, Schneider A, Kaufmann AM. 2010. A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8(+) T cells by their cytolytic function. *J Immunol Methods*. 360: 56-65.

**Hoffmann C**, Bachran C, Stanke J, Elezkurtaj S, Kaufmann AM, Fuchs H, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. 2010. Creation and characterization of a xenograft model for human cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 118: 76-80.

**Hoffmann C**, Stanke J, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. 2010. Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother*. 33: 136-45.

Bachran D, Schneider S, Bachran C, Urban R, Weng A, Melzig MF, **Hoffmann C**, Kaufmann AM, Fuchs H. 2010. Epidermal growth factor receptor expression affects the efficacy of the combined application of saponin and a targeted toxin on human cervical carcinoma cells. *Int J Cancer*. 127: 1453-61.

Loddenkemper C, **Hoffmann C**, Stanke J, Nagorsen D, Baron U, Olek S, Huehn J, Ritz JP, Stein H, Kaufmann AM, Schneider A, Cichon G. 2009. Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci*. 100: 1112-7.

Cichon G, Boeckh-Herwig S, Kuemin D, **Hoffmann C**, Schmidt HH, Wehnes E, Haensch W, Schneider U, Eckhardt U, Burger R, Pring-Akerblom P. 2003. Titer determination of Ad5 in blood: a cautionary note. *Gene Ther*. 10: 1012-7.

**Erklärung**

Ich versichere hiermit, gemäß der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 01.10.2002, daß

- die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der gemäß § 6 Absatz (3) angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt wurde,
- ich mich nicht bereits anderwärts um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen entsprechenden Doktorgrad besitze,
- mir die geltende Promotionsordnung vom 01.10.2002 bekannt ist.

.....

Datum

.....

Corinna Hoffmann